



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA BESNOITIOSE
(*Besnoitia besnoiti*) NUMA EXPLORAÇÃO DE BOVINOS DE CARNE

JOANA MARIA SANTOS DOMINGUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira
Leitão

ORIENTADOR:

Doutor George Thomas Stilwell

CO-ORIENTADORA:

Doutora Helga Marlene Cardoso Waap

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA BESNOITIOSE
(*Besnoitia besnoiti*) NUMA EXPLORAÇÃO DE BOVINOS DE CARNE

JOANA MARIA SANTOS DOMINGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor George Thomas Stilwell

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira
Leitão

ORIENTADOR:

Doutor George Thomas Stilwell

CO-ORIENTADORA:

Doutora Helga Marlene Cardoso Waap

2018

LISBOA

DECLARAÇÃO

Nome _____

Endereço eletrónico _____ Telefone _____/_____

Número do Bilhete de Identidade _____

Título: Dissertação ☐ Tese ☐

Orientador(es)

Ano de conclusão _____

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento

Nos exemplares das teses de doutoramento ou dissertações de mestrado entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e pelo menos outro para a Biblioteca da FMV-ULISBOA deve constar uma das seguintes declarações:

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa, _____ de _____ de 20__

(indicar a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

Ao meu pai...

Quem me transmitiu o gosto por este mundo dos grandes animais.

Espero que, onde quer que esteja, esteja orgulhoso de mim e de todo o meu percurso.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor George Stilwell, pela partilha dos seus enormes conhecimentos sobre grandes animais ao longo dos últimos meses, pela sua imprescindível ajuda na elaboração desta dissertação, respondendo sempre prontamente a cada dúvida; pela transmissão do seu tamanho gosto por esta área que é a clínica de espécies pecuárias; obrigada por toda a simpatia, dedicação e sentido de humor. Será sempre uma inspiração para mim.

À Dra. Helga Waap, por me ter feito ver que trabalhar no laboratório era muito mais giro do que aquilo que eu pensava; obrigada por toda a ajuda na parte laboratorial e na elaboração desta dissertação, pela transmissão de conhecimentos, por toda a sua enorme simpatia e disponibilidade.

Ao professor Telmo, por nunca negar a ajuda na parte estatística a um aluno finalista; obrigada por toda a paciência.

À Sara Salgado. Pela incrível aventura que me proporcionou na Irlanda. Por me ter feito perceber que estava no caminho certo, por me incentivar sempre. Por ter tornado estes meses longe da minha família muito mais fáceis; por todo o carinho que teve e que continua a ter comigo. Um obrigado nunca será suficiente. Agradeço também à família Magno por me ter recebido tão bem durante este período.

Ao Dr. João Maria Nobre pelo carinho e simpatia com que nos recebeu sempre na Estação Zootécnica, animando sempre as nossas quintas-feiras.

À professora Luísa, por ser uma fonte de inspiração e por toda a força que dá à tertúlia; pelas palavras sempre amigas e pelas tardes no campo com os toiros, para sempre memoráveis.

Ao proprietário e ao veterinário da exploração em estudo; muito obrigada por me terem aberto as portas para a realização deste trabalho, por toda a ajuda e paciência durante a recolha das amostras de sangue e dos dados.

Aos veterinários do *Farrely's*, por me terem ajudado e ensinado tanto durante o meu período de estágio na Irlanda. Obrigada por todo o incentivo e simpatia.

Às minhas queridas colegas de estágio, Maria Sara e Margarida, por terem animado sempre os nossos dias de campo e por me terem ajudado e apoiado em tudo. Foi um gosto enorme ter partilhado convosco este período do qual me irei lembrar sempre. Foram umas belas horas de volta dos cabritos e das úlceras, compensados sempre pelos almoços no Moço.

Aos meus amigos de faculdade por me terem acompanhado ao longo destes anos não só nas lutas para os exames, mas também nas noites de festa e diversão: André, Diana, Rita, João, Fábio e Saramago, obrigado! Às minhas Agrovets queridas, Madalena, Joana, Cláudia e Ana Cristina! Aos amigos da Tertúlia. À Maria Inês, Marta Leal da Costa, Beatriz Arroja, Inês Bessa Carvalho, Raquel Dourado, Margarida Silva, Sara Calisto. À minha afilhada Patrícia. Aos amigos da Rex, Diana, Marina, Mariana, Marco e Rui, os de sempre e para sempre. Aos amigos do League: João, João, Bernardo, Carolina e Mariana. Aos meus amigos do secundário, por me entenderem sempre que tinha de dizer que não por estar a estudar para os exames. A todos os meus outros amigos, que felizmente são tantos!

À minha mãe, o meu pilar ao longo destes anos. Por me transmitir sempre força para continuar e acreditar em mim e nas minhas capacidades; aos meus irmãos, Jorge, Inês e Célia, por toda a força que me deram ao longo do curso e por não me terem deixado desistir no início. Por me terem incentivado sempre mesmo quando o caminho parecia mais difícil. Por terem ouvido as minhas lamentações sempre antes dos exames. Sem dúvida que todos eles foram o meu porto-de-abrigo ao longo deste curso e de toda a minha vida. Obrigado pelo conforto que me deram nos dias mais marcantes, e por me dizerem inúmeras vezes que o pai estaria orgulhoso de mim.

À Sofia, por dar alegria à nossa casa, por me tornar numa “kiki” babada.

Ao meu pai, que não estando presente fisicamente, esteve sempre comigo. Foi sempre a força para continuar, e nunca desistir. Foi quem me transmitiu a paixão por esta área da Medicina Veterinária desde os primeiros anos da minha vida. Fez-me acreditar que as coisas não acontecem por acaso; espero conseguir um dia conseguir ser tão boa profissional e perceber tanto disto como ele. É e será sempre a minha maior inspiração.

Ao Fernando. Um grande obrigado por tudo.

À tia Fatinha, por gostar tanto de mim e por estar sempre à minha espera ao fim-de-semana.

A toda a minha família que eu adoro; tios, primos, obrigada por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso e em todos os momentos, bons ou maus, foram um suporte muito importante.

Apoio financeiro

Agradeço ao CIISA o financiamento deste projeto (projeto interno MIMV 16), sem o qual não teria sido possível realizá-lo.

Estudo das características epidemiológicas da besnoitiose (*Besnoitia besnoiti*) numa exploração de bovinos de carne

Resumo

A Besnoitiose bovina, causada por *Besnoitia besnoiti*, é uma doença dos bovinos que está a aumentar em Portugal, sendo já considerada como emergente na Europa. É responsável por manifestações cutâneas e sistémicas, cujos principais sintomas na fase aguda são a febre, marcha rígida, orquite e edemas sendo que na fase crónica se caracteriza por pele espessa e rígida, hiperqueratose, alopecia e atrofia testicular. No entanto, a maior parte dos casos permanece na forma subclínica. A sua importância económica está frequentemente associada a grandes prejuízos a vários níveis. Apesar de terem sido realizados muitos estudos nesta área, o conhecimento sobre a Besnoitiose é ainda muito limitado. Neste sentido, foi feito um estudo epidemiológico numa exploração de bovinos de carne do Ribatejo, onde já tinham sido confirmados vários casos positivos da doença; no estudo entraram animais das raças Salers, Charolês, Limousine, Blonde d'Aquitaine e animais cruzados, no sentido de se encontrarem fatores de risco associados à introdução da doença naquele local; procedeu-se à colheita de soro e à análise laboratorial através da técnica de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos; posteriormente foram comparados os dados relativos aos vários animais. A prevalência real de Besnoitiose na exploração em estudo é de 18,58%; os fatores de risco encontrados para esta doença foram a idade e a raça, concluindo-se que é mais prevalente em animais com idade compreendida entre um e dois anos ou superior a sete anos, em animais da raça Salers e em bovinos provenientes de França ou cujas mães foram importadas deste país. Os vitelos e os animais cruzados foram os que apresentaram uma menor prevalência de Besnoitiose. Devem ser implementadas estratégias de controlo da Besnoitiose mais rigorosas nas explorações portuguesas, uma vez que esta doença se encontra em expansão.

Palavras-chave: *Besnoitia besnoiti*, Besnoitiose bovina, parasita, quistos parasitários, pele, bovinos.

Study of Besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) epidemiologic characteristics in a beef cattle farm

Abstract

Bovine Besnoitiosis, caused by *Besnoitia besnoiti*, is a bovine disease which is increasing in Portugal and it is already regarded as an emerging disease in Europe. It is responsible for dermatological and systemic manifestations; in the acute phase it causes fever, rigid gait, orchitis and oedemas; in the chronic phase it leads to hard skin, hyperkeratosis, alopecia and testicular atrophy. However, most of the cases remain subclinical. Its economic importance is often associated with large losses at various levels. Although there are some studies in this area, the knowledge about Besnoitiosis is still very limited. Because of this, an epidemiological study was done in a beef herd in Ribatejo where some positive cases were confirmed before. In this study some different breeds were included: Salers, Charolês, Limousine, Blonde d'Aquitaine and crossbreed animals in order to find risk factors associated with the disease introduction in this farm; serum was collected from all animals in order to do laboratorial analysis by indirect immunofluorescence for antibody search. The data from all animals was compared. The real prevalence of Besnoitiosis in this herd is 18,58%; the risk factors found for this disease were age and breed. This disease is more prevalent in animals aged between one and two years old or older than seven years old as well as in Salers breed animals and bovine imported from France or which mothers were born in that country. Calves and crossbreed animals were those which prevalence of Besnoitiosis was lower. Control strategies for Besnoitiosis must be applied in Portuguese farms, once this disease is expanding.

Key words: *Besnoitia besnoiti*, bovine besnoitiosis, cysts, skin, bovine

Índice

Agradecimentos	iii
Apoio financeiro	iv
Resumo	v
Índice.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	x
Índice de gráficos.....	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xi
1. Relatório de estágio:	1
1.1. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL)	1
1.2. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) – Oeiras	2
1.3. Pat Farrely's & Partners – Trim, Irlanda	2
1.4. Outras atividades desenvolvidas durante o estágio.....	4
2. Introdução	5
3. Revisão bibliográfica	6
3.1. Caracterização geral da Besnoitiose	6
3.2. História da Besnoitiose Bovina.....	7
3.3. Ciclo de vida	9
3.4. Epidemiologia	11
3.5. Prevalência em Portugal	17
3.6. Sinais clínicos	18
3.6.1.Fase 1: estado febril	18
3.6.2. Fase 2: fase de anasarca	18
3.6.3. Fase 3: fase de alopecia e esclerodermia.....	19
3.7. Imunidade	24
3.8. Diagnósticos diferenciais	24
3.9. Alterações hematológicas e bioquímicas	25
3.10. Diagnóstico:	25
3.10.1. Citologia.....	26
3.10.2. Histologia	26
3.10.2.1. Lesões macroscópicas	27
3.10.2.2. Lesões microscópicas:	28
3.10.3.Serologia	30
3.10.4.Diagnóstico molecular - PCR.....	31
3.10.5.Teste de aglutinação direta modificado (B-MAT)	31
3.11. Tratamento:	31

3.12. Medidas de prevenção e profilaxia:.....	32
3.12.1 Profilaxia sanitária em zonas endémicas	33
3.12.2. Profilaxia em regiões indemnes.....	33
3.13. Importância económica da Besnoitiose	33
4. Estudo.....	35
4.1. Material e métodos	35
4.1.1. Caracterização da exploração	35
4.1.2 Animais testados	36
4.1.3. Método laboratorial	37
4.1.3.1. Centrifugação.....	38
4.1.3.2. Produção de taquizoítos	38
4.1.3.3. Controlos.....	39
4.1.3.4. Teste de imunofluorescência indireta para deteção de anticorpos anti- <i>Besnoitia</i>	
– IFAT	39
4.1.4 Recolha de dados	41
4.1.5. Análise estatística	41
4.2. Resultados	42
4.2.1. Prevalência real.....	42
4.2.2. Resultados conforme a raça	42
4.2.3. Resultados conforme a idade	43
4.2.4. Resultados conforme o sexo	44
4.2.5. Resultados conforme a origem	44
4.2.6. Resultados conforme a origem da mãe	45
4.2.7. Resultados - análise multivariada (regressão logística)	45
4.3. Discussão.....	47
4.4. Conclusão	51
5. Bibliografia.....	53
6. Anexos.....	60
ANEXO 1 - Protocolo laboratorial – método de imunofluorescência indireta (IFAT)	60
ANEXO 2 - Prevalência real (geral)	61
ANEXO 3 - Prevalência real (vitelos)	62
ANEXO 4 - Prevalência real (adultos)	63
ANEXO 5 – Outras atividades desenvolvidas durante o período de estágio: Póster “Caso clínico atípico de Besnoitiose (<i>Besnoitia besnoiti</i>) num touro Limousine”	64
ANEXO 6 - Outras atividades desenvolvidas durante o período de estágio: Póster “Aplicação tópica de anestésicos locais para controlo da dor durante a aparagem curativa de lesões podais de vacas leiteiras – dados preliminares”	65

Índice de figuras:

Figura 1 - Cesariana em ovelha	3
Figura 2 - Claudicação em vaca leiteira, devido a lesão nas unhas mediais dos membros anteriores	3
Figura 3 - Prolapso uterino em vaca	3
Figura 4 - Caso de Besnoitiose atípica em touro Limousine	3
Figura 5 - Sanidade em touro Limousine (tuberculinização)	4
Figura 6 - Resolução de parto em vaca leiteira	4
Figura 7- Quisto de Besnoitia besnoiti onde se observa a morfologia dos bradizoítos isolados. Coloração da hematoxilina-eosina. Objetiva x100.....	10
Figura 8 -Fotografia de secção da periferia de um quisto de Besnoitia besnoiti obtida por microscopia eletrónica.....	11
Figura 9 - Mapa mundial de distribuição de Besnoitiose bovina	13
Figura 10 - Sazonalidade dos casos clínicos de Besnoitiose em França, durante os anos de 1995 e 1998	15
Figura 11 - Distribuição geográfica das freguesias e concelhos positivos em Portugal	17
Figura 12 - Alterações provocadas pela Besnoitiose ao longo do tempo. Lesões a nível dos tetos e dos membros	21
Figura 13 - Espessamento marcado, esclerodermia e eritema no membro de uma vaca com Besnoitiose	21
Figura 14 - Quistos de Besnoitia besnoiti na vagina e laminite crónica na sola de um animal infetado	22
Figura 15 – Quistos parasitários na conjuntiva da esclera	22
Figura 16 - Fotomicrografia ilustrando múltiplos quistos de Besnoitia besnoiti na derme de um animal infetado	29
Figura 17 - Soros de bovino contidos em eppendorfs, obtidos após centrifugação das amostras de sangue	38
Figura 18 - Taquizoítos de Besnoitia besnoiti em cultura de células Vero	39
Figura 19 - Observação da fluorescência de um caso positivo de Besnoitiose ao microscópio ótico com luz ultravioleta	41

Índice de tabelas

Tabela 1- Espécies de Besnoitia.....	7
Tabela 2 - Sequência temporal do aparecimento dos sinais clínicos	23
Tabela 3 - Desenvolvimento da patogenia na pele dos bovinos	23
Tabela 4 – Exame histológico post-mortem de animais com infecção severa por B. besnoiti..	27
Tabela 5 - Tamanho dos quistos de B. besnoiti em função dos tecidos do animal.....	29
Tabela 6 - Distribuição de animais por sexo.....	36
Tabela 7 - Distribuição dos animais conforme a origem	36
Tabela 8 - Frequência dos resultados em função da raça.....	42
Tabela 9 - Frequência dos resultados em função da idade.....	43
Tabela 10 - Frequência dos resultados em função do sexo.....	44
Tabela 11 - Frequência dos resultados em função da origem	45
Tabela 12 - Frequência dos resultados em função da origem da mãe.....	45
Tabela 13 - Resultados da regressão logística - resultado em função das variáveis idade, origem da mãe, sexo e raça	46

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição dos animais conforme a idade.....	37
Gráfico 2 - Distribuição dos animais conforme a raça.....	37
Gráfico 3 - Relação entre o número de animais positivos e de animais testados conforme a idade	43
Gráfico 4 - Prevalência de casos positivos conforme a idade	44

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
AST	Aspartato aminotransferase
B-MAT	<i>Besnoitia</i> - Teste de Aglutinação Direta Modificado (<i>Besnoitia-Modified Agglutination Test</i>)
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial Bovino
BVD	Diarreia Viral Bovina
CIISA	Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal
CK	Creatina quinase
CO ₂	Dióxido de carbono
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
Ex.	exemplo
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
FSH	Hormona folículo-estimulante
HE	Hematoxilina-eosina
IBR	Rinotraqueíte Infeciosa Bovina
IC	Intervalo de confiança
IFAT	<i>Immunofluorescence antibody test</i>
Ig	Imunoglobulina
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LMV	Laboratório de Medicina Veterinária
MIMV	Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato salino
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Polymerase chain reaction – real time</i>
SBF	Soro bovino fetal

1. Relatório de estágio:

1.1.Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL)

O meu estágio curricular foi composto por várias partes: os primeiros cinco meses (Setembro-Janeiro) foram realizados na Faculdade de Medicina Veterinária, com o professor Dr. George Stilwell, acompanhando as aulas de Clínica de Espécies Pecuárias, em várias explorações do centro de Portugal, sobretudo na zona de Lisboa e do Ribatejo. Considero que este período foi de uma extrema importância uma vez que me permitiu obter bases consolidadas nos meus conhecimentos na clínica de Ruminantes. Nos dias não correspondentes às aulas de Clínica de Espécies Pecuárias, acompanhei o médico veterinário de uma exploração de bovinos de carne situada na região do Ribatejo. Durante estes meses tive a oportunidade de contactar com vários médicos veterinários, aprendendo diferentes métodos de trabalho. Foram muito diversas as intervenções ao longo deste período de estágio tais como: vacinação (Rinotraqueíte Infeciosa Bovina – IBR, Diarreia Viral Bovina – BVD, diarreias neonatais, Clostridiose, Aujeszky) e desparasitação; intervenções ao nível da sanidade (tuberculinização e colheita de sangue para pesquisa de brucelose); lavagens prepuciais em vitelos para exportação (pesquisa de *Tritrichomonas foetus* e *Campylobacter foetus venerealis*); colocação de PRIDs (*Progesterone releasing intravaginal device*) e CIDRs (*Controlled internal drug release*) para sincronização do estro em novilhas e vacas; inseminação artificial; diagnósticos de gestação por palpação retal e por ecografia, cirurgias de vários tipos (correção de deslocamento do abomaso por abomasopexia), cesarianas, assistência a partos eutócicos e distócicos; manejo do vitelo recém-nascido no pós-parto e cuidados neonatais; tratamento de diarreias neonatais; tratamentos de retenção placentária, metrites, mastites; tratamento de Queratoconjuntivite Infeciosa (por *Moraxella bovis*); tratamento de timpanismo espumoso; descornas em cabritos; descornas em vitelos; necrópsias; procedimentos de inscrição de animais nos livros genealógicos das respetivas raças; ordenha; teste californiano de mastites (TCM); tratamento de lesões podais tais como úlceras da sola, úlceras da pinça, dermatite digital, panarício, dupla sola e doença da linha branca; eutanásia, entre outros. Realizei ainda o Curso de Inseminação Artificial em Bovinos, lecionado pela secção de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no qual obtive aprovação.

1.2. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) – Oeiras

Durante este período tive a possibilidade de dar início à parte laboratorial da minha dissertação, realizada no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – INIAV, em Oeiras, na secção de Parasitologia, sob orientação da Dra. Helga Waap. O diagnóstico laboratorial de *Besnoitia besnoiti* foi realizado com a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFAT). Tive, também, a oportunidade de assistir a outras técnicas laboratoriais nomeadamente a manutenção e propagação de *B. besnoiti* em culturas de células Vero, métodos coprológicos para pesquisa de parasitas intestinais, método de digestão de amostras combinadas utilizando um agitador mecânico para pesquisa de larvas de *Trichinella spp.*, imunofluorescência indireta para pesquisa de *Leishmania infantum*, entre outros.

1.3. Pat Farrely's & Partners – Trim, Irlanda

Por fim, estive cerca de dois meses e meio na Irlanda (Fevereiro-Abril), onde tive a oportunidade de acompanhar a Dra. Sara Salgado e vários veterinários de Clínica de Espécies Pecuárias pertencentes à clínica *Pat Farrely's & Partners*. Durante este período foram muitas e diversas as intervenções realizadas, principalmente porque o período de estágio correspondeu à época mais trabalhosa para os veterinários, altura da Primavera, na qual há o maior número de partos e todos os problemas e patologias a eles associados. São exemplos das intervenções realizadas as seguintes: sanidade (tuberculinização); controlo de paratuberculose (*Johne's disease*) através de colheita de sangue para obtenção de soro e confirmação dos positivos à serologia com PCR em amostras de fezes; descorna em bovinos adultos; castração (por estrangulamento); partos eutócicos e distócicos em ovelhas e em vacas; fetotomias em ovinos; tratamento de mastites, retenção placentária, metrites, prolapsos uterinos, prolapsos vaginais; diagnósticos de gestação por ecografia e por palpação transretal; medicina das populações – problemas ao nível do grupo (sobretudo diarreias e pneumonias em vitelos e claudicação numa vacada (problema de dermatite digital)); tratamento de vitelos: pneumonias, acidoses, diarreias por vários agentes; cirurgias tais como: amputação de dígito num novilho, cesarianas em ovelhas e em vacas, deslocamento do abomaso à esquerda e à direita (resolução por omentopexia, piloropexia, abomasopexia e paramediana); epididimectomias; extração de abscessos, entre outras; tratamento de problemas podais (úlceras da sola, doença da linha branca, falsa sola, dermatite digital, panarício); eutanásia; entre outros. Tive a oportunidade de assistir, ao longo de um dia, ao leccionamento da unidade curricular de Cirurgia de Grandes Animais na Universidade de Medicina Veterinária de Dublin (*University College of Dublin*), onde

observei várias cirurgias como tenectomia do tibial, resolução de *atresia ani*, resolução de uma reincidência de deslocamento do abomaso entre outras. A experiência neste país foi uma experiência muito enriquecedora, não só a nível profissional, mas também pessoal; permitiu-me conhecer a realidade da pecuária num país diferente, diferentes métodos de trabalho e deu-me uma grande conhecimento por ser uma clínica tão intensiva, com um grande número de casos diários.

Figura 1 - Cesariana em ovelha (Fonte: original)



Figura 2 - Claudicação em vaca leiteira, devido a lesão nas unhas mediais dos membros anteriores (Fonte: original)



Figura 3 - Prolapso uterino em vaca (Fonte: original)



Figura 4 - Caso de Besnoitiose atípica em touro Limousine (Fonte: original)



Figura 5 - Resolução de parto em vaca leiteira
(Fonte: original)



Figura 6 - Sanidade em touro Limousine
(tuberculinização) (Fonte: original)



1.4.Outras atividades desenvolvidas durante o estágio

Durante o estágio tive a possibilidade de elaborar três *posters*, em colaboração com o professor George Stilwell e com as minhas colegas estagiárias (Anexo 5 e 6). Tive também a oportunidade de colaborar no livro “Bem-Estar em Ruminantes” da autoria do Dr. George Stilwell.

- Poster 1 – “CASO CLÍNICO ATÍPICO DE BESNOITIOSE (*Besnoitia besnoiti*) NUM TOURO LIMOUSINE” apresentado nas XIX Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria nos Açores (São Miguel) em Novembro de 2017;
- Poster 2 – “APLICAÇÃO TÓPICA DE ANESTÉSICOS LOCAIS PARA CONTROLO DA DOR DURANTE A APARAGEM CURATIVA DE LESÕES PODAIS DE VACAS LEITEIRAS – DADOS PRELIMINARES” apresentado no Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários em Abril de 2018;
- Poster 3 – “BESNOITIOSIS AS AN EMERGING AND EXOTIC DISEASE – NEW CLINICAL FEATURES IN BREEDING BULLS” a ser apresentado no *World Buiatric Congress* no Japão em Agosto de 2018;
- Comunicação oral: “TOPICAL APPLICATION OF LOCAL ANESTHESIA FOR PAIN CONTROL DURING THE CURATIVE TRIMMING OF PODAL LESIONS OF DAIRY COWS”, a ser realizada no *World Buiatric Congress* no Japão em Agosto de 2018;
- Colaboração no Livro “*Bem-Estar dos Ruminantes*” da autoria do Dr. George Stilwell (2017).

2. Introdução

A Besnoitiose bovina é uma doença provocada por *Besnoitia besnoiti*, um parasita com especial tropismo para a pele e para o tecido conjuntivo. É responsável por manifestações cutâneas e sistémicas, apresentando como principais sinais clínicos febre, descargas nasais, salivação, marcha rígida, orquite, edema subcutâneo na fase aguda, sendo que na fase crónica se caracteriza por pele espessa, rígida, hiperqueratose, alopecia e atrofia dos testículos. No entanto, na maior parte dos casos, esta doença permanece subclínica. O facto de não existir um tratamento nem uma vacina segura e eficaz, juntamente com o desconhecimento do seu ciclo de vida e a baixa consciencialização para esta doença, torna difícil a implementação de estratégias de prevenção e controlo. Em 2010 a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) emitiu um parecer, classificando a Besnoitiose como uma doença emergente, devido à expansão e ao aumento da sua incidência na Europa. Trata-se de uma doença em expansão em Portugal, principalmente na região do Alentejo, tendo sido detetados alguns casos clínicos na região do Ribatejo nos últimos anos (Meireles *et al*, 2014; Waap, Nunes, Cortes, Leitão, & Vaz, 2014; G. Stilwell, comunicação pessoal, 2018). O estudo da Besnoitiose bovina em Portugal vai ao encontro das recomendações emitidas a nível europeu e pretende apoiar o sector pecuário nacional, designadamente no que se refere à promoção da deteção precoce e ao combate à expansão da doença. A sua importância económica está associada a prejuízos a vários níveis, como por exemplo, na produção de carne e peles, infertilidade nos machos, refugo de animais, reprovações no matadouro e mortalidade.

Apesar de todas as contribuições para o estudo desta doença ao longo de cerca de cem anos, o conhecimento atual sobre a mesma é ainda muito limitado. Neste sentido, os objetivos principais deste estudo foram avaliar a prevalência da Besnoitiose bovina numa exploração de bovinos de carne, comparando posteriormente os vários dados recolhidos entre diferentes raças, sexo, idades, origem (animais nascidos na exploração ou comprados ao exterior, tanto em Portugal como no estrangeiro) e origem da mãe, fazendo assim uma caracterização epidemiológica da exploração, para encontrar os fatores de risco associados a esta doença naquele local. Para tal, foi realizada uma colheita aleatória de sangue a vários animais das vacadas em estudo, foi feito um registo minucioso de todos os dados dos animais testados relativos à idade, raça, origem, origem da mãe, número de identificação dos pais, raça dos pais e touros com os quais teve contacto; foi realizado o teste de imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos no soro dos animais; posteriormente compararam-se os resultados obtidos e verificaram-se quais os fatores de risco associados à Besnoitiose na exploração em estudo.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Caracterização geral da Besnoitiose

A Besnoitiose bovina é provocada por um parasita protozoário, *Besnoitia besnoiti* (Bigalke, 1968). Trata-se de um parasita intracelular obrigatório (Pols, 1960), pertencente à ordem Eucoccidiorida, classe Conoidasida, filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae. As espécies de *Besnoitia* estão estreitamente relacionadas com as espécies do género *Toxoplasma gondii*, *Neospora spp.* e *Hammondia spp.* (Ellis *et al.*, 2000).

Atualmente, o género *Besnoitia* compreende quatro espécies que infetam grandes animais (*B. besnoiti*, *Besnoitia caprae*, *Besnoitia tarandi* e *Besnoitia bennetti*) e seis espécies que afetam pequenos animais (*Besnoitia darlingi*, *Besnoitia jellisoni*, *Besnoitia wallacei*; *Besnoitia oryctofelisi*, *Besnoitia akodoni* e *Besnoitia neotomofelis*) (Tabela 1) (Ellis *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2009). As espécies de *Besnoitia* distinguem-se sobretudo pela especificidade do hospedeiro intermediário (Ferreira, 1985; Frenkel, 1977). Os quistos formados, patognomónicos da infeção (Álvarez-García, García-Lunar, Gutiérrez-Expósito, Shkap, & Ortega-Mora, 2014) são muitas vezes visíveis a “olho-nu”, surgindo a partir dos fibroblastos em muitos tecidos (Frenkel, 1977).

Esta doença caracteriza-se por uma evolução sintomática com três fases sucessivas: a primeira corresponde a uma síndrome febril, a segunda caracteriza-se por edemas, sendo a última uma fase de esclerodermia e de alopecia (Dorchies, Schelcher, & Gottstein, 2007). No entanto, na maioria dos animais, a infeção permanece subclínica (Bigalke & Prozesky, 2004).

A taxa de mortalidade é baixa (até 10% dos casos), apesar do facto de cerca de 70-90% dos animais ter anticorpos específicos anti-*Besnoitia*, (Bigalke, 1968), ocorrendo sobretudo durante as fases de anasarca ou de esclerodermia (Bigalke & Prozesky, 2004); a taxa de morbilidade é também baixa, tratando-se de uma doença que conduz a uma grande debilidade dos animais (Bigalke & Prozesky, 2004),

O estudo da Besnoitiose é bastante difícil devido à dificuldade em reproduzir a doença experimentalmente; além disso, os sinais clínicos iniciais da doença podem passar muitas vezes despercebidos nos casos adquiridos naturalmente. Surgiram alguns avanços na descoberta de informação acerca dos estádios iniciais da Besnoitiose, através do uso de coelhos, animais suscetíveis à infeção artificial com formas proliferativas e quísticas de *B. besnoiti*, desenvolvendo lesões muito similares àsquelas observadas naturalmente nos bovinos (Dorchies *et al.*, 2007).

Tabela 1- Espécies de *Besnoitia* (adaptado de Mehlhorn *et al.*, 2009)

Nome da espécie	Primeira descrição	Hospedeiro intermediário	Hospedeiro definitivo	Literatura – transmissão	Literatura - morfologia
<i>B. besnoiti</i>	Besnoit e Robin (1912)	Ruminantes	Desconhecido	Peteshev <i>et al.</i> (1974)	Dubey <i>et al.</i> (2003)
<i>B. benetti</i>	Bennett (1927)	Burro	Desconhecido	-	Dubey <i>et al.</i> 2005
<i>B. caprae</i>	Heydorn <i>et al.</i> (1984)	Cabra	Desconhecido	-	Heydorn <i>et al.</i> (1984); Njenga <i>et al.</i> (1995)
<i>B. tarandi</i>	Hadwen (1922)	Renas (<i>Rangifer tarandus caribou</i>)	Desconhecido	-	Dubey <i>et al.</i> (2004)
<i>B. darlingi</i>	Darling (1910)	Gambá (<i>Didelphis virginiana</i>)	<i>Lynx rufus</i>	Smith and Frenkel (1977)	Dubey <i>et al.</i> (2002)
<i>B. wallacei</i>	Wallace e Frenkel (1975)	Desconhecido	Gato	Wallace and Frenkel (1975); Frenkel (1977)	
<i>B. oryctofelisi</i>	Dubey e Lindsay (2003)	Desconhecido	Gato	Dubey and Lindsay (2003)	Dubey and Lindsay (2003)
<i>B. jellisoni</i>	Frenkel (1953)	Rato	Desconhecido	-	Sénaud and Mehlhorn 1978; Mehlhorn <i>et al.</i> 1974
<i>B. akadoni</i>	Dubey <i>et al.</i> , 2003	-	Desconhecido	-	Dubey <i>et al.</i> , 2003
<i>B. neotomofelis</i>	Dubey & Yabsley, 2010	Rato	-	Dubey & Yabsley, 2010	Dubey & Yabsley, 2010

3.2.História da Besnoitose Bovina

A história da Besnoitose bovina começa logo pelas dificuldades encontradas na identificação do agente etiológico da doença, refletindo-se isto em inúmeros sinónimos tais como “Elefantíase”, “Anasarca do boi”, “Sarcosporidiose cutânea bovina”, “Sarcosporidiose bovina”, “Globidiose cutânea bovina”, “Dermatite verrucosa dos bovinos” e “Besnoitose bovina” (Cadeac, 1884; Besnoit & Robin, 1912; Cuillé & Chelle, 1937; Pinto 1944 [citados em Ferreira, 1985]; Franco & Borges, 1915; Pols, 1960).

O parasita *B. besnoiti* foi descrito pela primeira vez em França, em 1912, na Escola Veterinária de Toulouse, quando Besnoit e Robin detetaram inúmeros quistos esféricos, de paredes espessas, contendo muitos “esporos” na pele e no tecido subcutâneo de vacas infetadas cronicamente; no entanto, a sua importância económica esteve durante décadas exclusivamente associada a países tropicais de África e da Ásia (Besnoit & Robin, 1912) (Cortes *et al.*, 2006). Só a partir do século XX é que esta doença adquiriu uma maior importância na Europa, devido ao aumento do número de casos e à sua expansão. Em 1915, Franco e Borges publicaram um

estudo sobre a ocorrência de Besnoitiose bovina em Portugal, baseado em animais que tinham sido rejeitados no matadouro entre 1885 e 1915. Nesta altura, os quistos característicos desta doença eram designados por “areias” (Franco & Borges, 1915).

Em Portugal, a Besnoitiose bovina sempre esteve associada apenas à região do Alentejo, sendo que, desde 1885 até 2012, todos os casos clínicos existentes no país, foram reportados apenas nessa zona. No entanto, em 2012 foi confirmado um surto da doença numa manada de raça Charolesa no concelho de Santarém (G. Stilwell, comunicação pessoal, 2018); Waap *et al.*, (2014) e Meireles *et al.* (2014) também confirmaram a existência de Besnoitiose bovina em cinco explorações no norte de Portugal, junto à fronteira com Espanha, e em duas explorações na zona centro, sendo estas as primeiras evidências serológicas de *B. besnoiti* fora da região alentejana (Figura 7).

Na última década, a Besnoitiose bovina foi observada ao longo das montanhas dos Pirenéus e em áreas não endémicas tais como o País Basco; foram identificadas áreas endémicas em Portugal (Cortes *et al.*, 2005; Cortes *et al.*, 2006), Espanha (centro e sul, na fronteira com Portugal) (Juste, Cuervo, Marco, & Oregui, 1990) e França (casos graves nos Alpes franceses, zona do Maciço Central, e na zona oeste do país) (Alzieu, Dorchies, Schelcher, & Gottstein, 2007). Na Alemanha houve um grande surto que surgiu devido à importação de animais das raças Charolesa e Limousine pertencentes a uma vacada francesa, na qual 80% dos animais estavam infetados (Schares *et al.*, 2009). O primeiro diagnóstico de Besnoitiose bovina na Irlanda foi feito em 2015, numa exploração leiteira, cuja seroprevalência já estava nos 68% (Ryan *et al.*, 2016). A doença foi ainda diagnosticada na Suíça (Lesser *et al.*, 2012), em animais importados de França e da Alemanha. Mais recentemente, reportaram-se os primeiros casos na Hungria (Hornok, Fedák, Baska, Hofmann-Lehmann & Basso, 2014) e na Croácia (Beck, Štoković & Pleadin, 2013). Na Itália, o primeiro foco surgiu nos anos 90 e foi associado a animais importados de França (Agosti, Belloli, Morini & Vacirca, 1994); mais tarde foram diagnosticados casos autóctones nos Apeninos do Norte (Gollnick, Gentile & Schares, 2010; Gentile *et al.*, 2012) e na região centro (Manuali *et al.*, 2011).

A cultura *in vitro* de *B. besnoiti* permitiu a produção de parasitas atenuados, que foram depois usados na produção de uma vacina experimental no Sul de África (Bigalke, Basson, McCully, Bosman, & Schoeman, 1974) e em Israel (Pipano, 1997, citado em Cortes *et al.*, 2006), o que permitiu o início de estudos imunológicos, quimioterápicos (Shkap *et al.*, 1989, 1990; Shkap & Pipano, 1993; Elsheikha & Mansfield, 2004; Shkap *et al.*, 1987b, citados em Cortes *et al.*, 2006; Shkap, Reske, Pipano, Fish & Baszler, 2002), filogenéticos e ultraestruturais do género *Besnoitia* (Dubey, Shkap, Pipano, Fish & Fritz, 2003; Ellis *et al.*, 2000; Shkap, Yakobson, & Pipano, 1988).

O aumento dos casos de Besnoitiose bovina na Europa nos últimos anos conduziu à sua classificação como uma doença emergente, pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) no ano 2010. O relatório emitido reconhece que muitos aspetos relacionados com a epidemiologia da Besnoitiose bovina permanecem desconhecidos, incluindo a prevalência e a incidência da infeção e da doença, bem como as formas de transmissão, em particular os fatores de risco associados à mesma. Apesar de na Europa terem sido confirmadas apenas infeções por *B. besnoiti* em bovinos, a EFSA reconheceu, no seu parecer, a possibilidade de ruminantes selvagens e roedores estarem envolvidos como reservatórios do parasita (EFSA, 2010).

3.3. Ciclo de vida

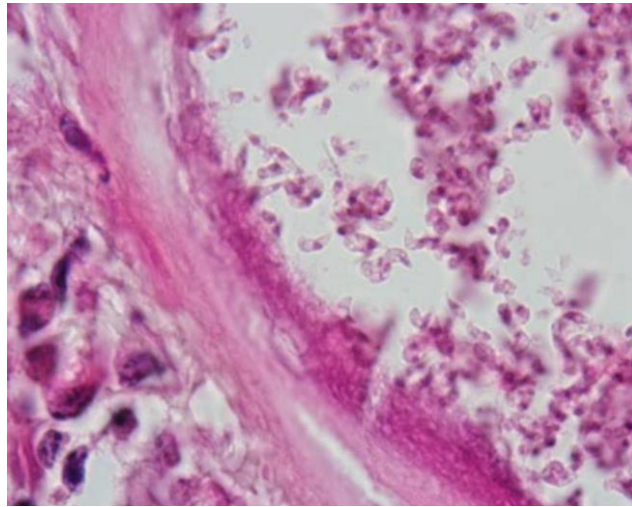
B. besnoiti apresenta dois estádios infecciosos conhecidos: os taquizoítos, caracterizados por uma replicação rápida, e os bradizoítos que correspondem a formas de multiplicação lenta do parasita, contidos em quistos no tecido subcutâneo. Admite-se a existência de um terceiro estádio, que envolve oocistos, mas até à data ainda não se conseguiu demonstrar o seu ciclo de vida (Fernández-García et al., 2010; Ferreira, 1985).

Os parasitas multiplicam-se por endodiogenia (reprodução assexuada) nas células endoteliais dos vasos venosos (Basson, McCully, & Bigalke, 1970) e (menos) arteriais, nos macrófagos e nos fibroblastos (Bigalke, 1981) particularmente na pele, fáscias, tecido conjuntivo intermuscular, globo ocular, trato respiratório superior e testículos (Basson et al., 1970; Ferreira, 1985). Os taquizoítos medem entre 5 a 9 µm de comprimento e 1,5 a 3,8 µm de largura, sendo a sua forma variada (ovóide a curva, idêntica à forma de uma banana) (Ferreira, 1985).

Os taquizoítos invadem outras células endoteliais para produzir mais taquizoítos; podem invadir também outras células como monócitos, histiócitos, granulócitos, neutrófilos e células de Sertoli – é esta etapa que corresponde à fase de aparecimento de anasarca, seguida pela formação dos quistos (Bigalke & Prozesky, 2004).

Os bradizoítos encontram-se nos histiócitos; têm forma alongada, por vezes ligeiramente curva, com extremidades arredondadas, núcleo pequeno e basófilo próximo da extremidade posterior (Cortes et al., 2003) (Figura 7); uma vez na célula do hospedeiro, ficam contidos num vacúolo parasitóforo; depois multiplicam-se comprimindo gradualmente os múltiplos núcleos e o citoplasma da célula hospedeira, na direção do quisto em desenvolvimento (Basson et al., 1970).

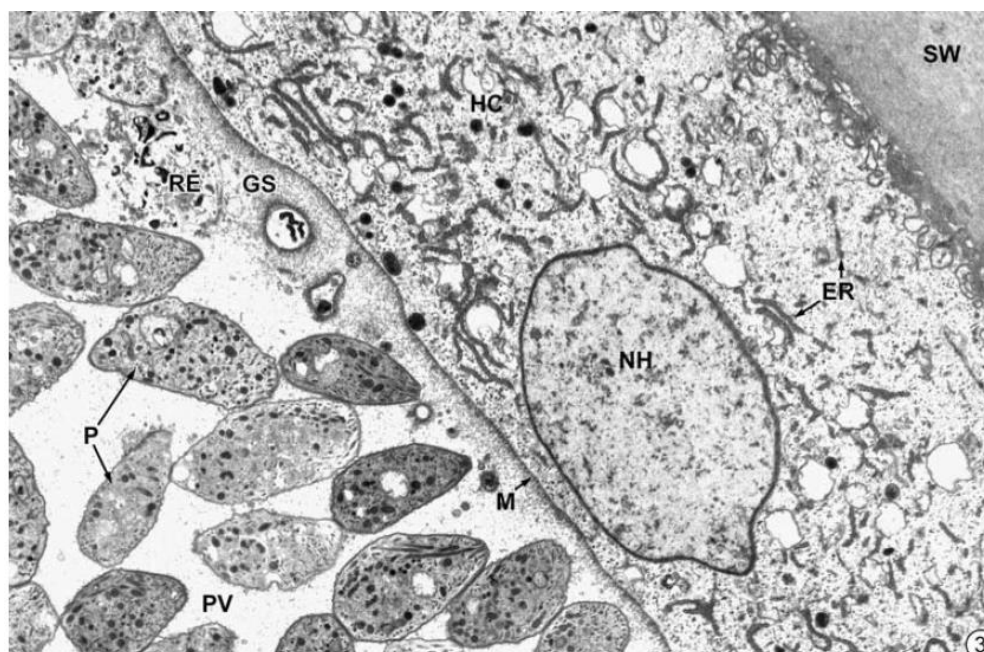
Figura 7- Quisto de *Besnoitia besnoiti* onde se observa a morfologia dos bradizoítos isolados. Coloração da hematoxilina-eosina. Objetiva x100 (Fonte:



A formação de quistos surge após a proliferação do organismo nas células do hospedeiro; as células que são parasitadas são os histiócitos que podem ser encontrados na camada íntima, em qualquer zona da parede das veias ou numa posição justa-vascular (Basson *et al.*, 1970); é a partir destas células, contendo milhares de bradizoítos, que os quistos se formam, causando hipertrofia e hiperplasia das células hospedeiras (Dorchies *et al.*, 2007).

A parede dos quistos apresenta três camadas: uma hialina externa, uma média que é composta pelo citoplasma de células hospedeiras com inúmeros núcleos, e uma interna, correspondente à membrana do vacúolo parasitóforo (Figura 8) (Majzoub *et al.*, 2010; Rostaher *et al.*, 2010 citados em Ryan *et al.*, 2016; Frey *et al.*, 2013; Gentile *et al.*, 2012; Hornok *et al.*, 2014). A inclusão do(s) núcleo(s) da célula hospedeira na parede quística é uma característica única do género *Besnoitia* (Dubey *et al.*, 2003).

Figura 8 -Fotografia de secção da periferia de um quisto de *Besnoitia besnoiti* obtida por microscopia eletrônica (Fonte: (Mehlhorn *et al.*, 2009)



É evidente uma parede secundária do quisto condensada (SW), a célula hospedeira (HC) contendo um vacúolo parasitóforo (PV), com inúmeros bradizoítos (P) no interior; notar que o vacúolo parasitóforo é limitado por uma membrana celular simples.

Observa-se geralmente uma reação inflamatória celular periquística, cujas células constituintes são na sua maioria, macrófagos (formando, por vezes, pequenas células gigantes com poucos núcleos), e em menor número, linfócitos, granulócitos, eosinófilos e alguns plasmócitos (Cortes *et al.*, 2003).

3.4.Epidemiologia

Os bradizoítos presentes nos quistos cutâneos podem ser transmitidos mecanicamente de um bovino infetado para um bovino sã, através de insetos picadores, como os tabanídeos (*Tabanocella denticornis*, *Atylotus nigromaculatus*), moscas-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) (Bigalke, 1968), moscas tse-tse (*Glossina brevipalpis*) (Olias, Schade, & Mehlhorn, 2011) e mosquitos (*Culex simpsoni* e espécies de *Culex* por identificar), mas também por via iatrogénica, através de agulhas infetadas (principalmente durante a terapia de grupo, em que se usa a mesma agulha em vários animais) (Bigalke, 1968; Dorchies *et al.*, 2007). Apenas as fêmeas dos tabanídeos picam os animais, sendo mais ativas entre Maio e Setembro. Por outro

lado, tanto as fêmeas como os machos das moscas-do-estábulo são hematófagos, parasitando os animais; picam essencialmente os flancos, períneo e membros (Dorchies *et al.*, 2007). Os tabanídeos permanecem infeciosos por picada durante 24 horas sendo que os insetos *S. calcitrans* apresentam infeciosidade durante 1 hora apenas (Bigalke, 1968).

Não se sabe ao certo se os artrópodes podem veicular este parasita, nomeadamente alguns membros da família *Ixodidae* (Bigalke, 1960). Os insetos picadores anteriormente referidos são atraídos pelo tamanho do hospedeiro e por substâncias produzidas pelo próprio animal, especialmente o dióxido de carbono, cuja produção vai aumentando ao longo da vida dos bovinos (Konstantinov & Ul'ianov, 1988; Torr, Mangwiro, & Hall, 2006). Este facto, associado a maior atividade defensiva dos animais jovens, reduz, assim, o risco de estes serem picados pelos insetos, o que poderá explicar a tendência para uma menor prevalência nesta população comparativamente aos animais mais velhos (Torr & Mangwiro, 2000). Outro facto que sustenta a hipótese dos insetos serem vetores da Besnoitiose é a deteção deste parasita em esfregaços obtidos a partir da região periorbital dos animais doentes, local preferencial para esse tipo de artrópodes (Cortes *et al.*, 2003). A localização dos quistos de *Besnoitia* nos bovinos também é altamente sugestiva da transmissão por insetos uma vez que corresponde aos locais preferenciais de alimentação destes (Bigalke, 1968). A sazonalidade desta doença também sustenta a hipótese da transmissão vetorial da Besnoitiose (Dorchies *et al.*, 2007).

Embora nunca tenha sido demonstrada, admite-se a hipótese de transmissão através da ingestão de oocistos esporulados no solo, eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, com a passagem dos esporozoítos para a circulação sanguínea e, possivelmente, para a circulação linfática (Ferreira, 1985). Estudos experimentais antigos sugeriram os gatos domésticos como sendo hospedeiros finais para a *B. besnoiti*. No entanto, estes achados não foram confirmados em estudos posteriores. Gatos domésticos, gatos selvagens (*Felis chaus*), caracais (*Caracal caracal*), ginetos manchados (*Genetta genetta*), um leão (*Panthera leo*), leopardos (*Panthera pardus*), chitas (*Acinonyx jubatus*), mangustos (*Mungus mungo*), cão doméstico, chacais (*Canis mesomelas*), uma raposa (*Vulpes chama*), seis espécies de cobras e abutres (*Gyps africanus*) receberam quistos de *B. besnoiti per os*, provenientes de bovinos naturalmente infetados do Norte de África ou de Israel; não foram detetados oocistos nas fezes dos animais; no entanto, alguns dos gatos alimentados com quistos do parasita desenvolveram anticorpos contra *B. besnoiti*, sugerindo que o parasita possa ser infecioso para esta espécie (Olias *et al.*, 2011); através da técnica de *immunoblot*, estes gatos exibiram um padrão reacional contra antígenos de taquizoítos muito similar ao observado nos bovinos infetados naturalmente (Basso, Schares, Gollnick, Rütten, & Deplazes, 2011). Sabe-se que os gatos podem ser hospedeiros definitivos de várias outras espécies de *Besnoitia* (Tabela 1). Nos casos conhecidos, os hospedeiros

intermediários contraem a Besnoitiose através da ingestão de oocistos esporulados do tipo *Isospora*, libertados nas fezes de membros da família dos felinos (Basson *et al.*, 1970). Os bovídeos domésticos e selvagens (antílopes) são hospedeiros intermediários naturais de *B. besnoiti* (EFSA, 2010; Ferreira, 1985); no entanto, nos antílopes em que a infeção foi descrita (gnus e impalas), os isolados pareceram ser visceros e não dermatotrópicos (como no caso dos bovinos), sendo relativamente apatogénicos nestes animais (Bigalke, 1968). Existem dados sobre a existência de um ciclo silvático, que confirmaram a suscetibilidade de alguns roedores, tal como a ratazana, na qual foi demonstrada a persistência do parasita (Basso *et al.*, 2011).

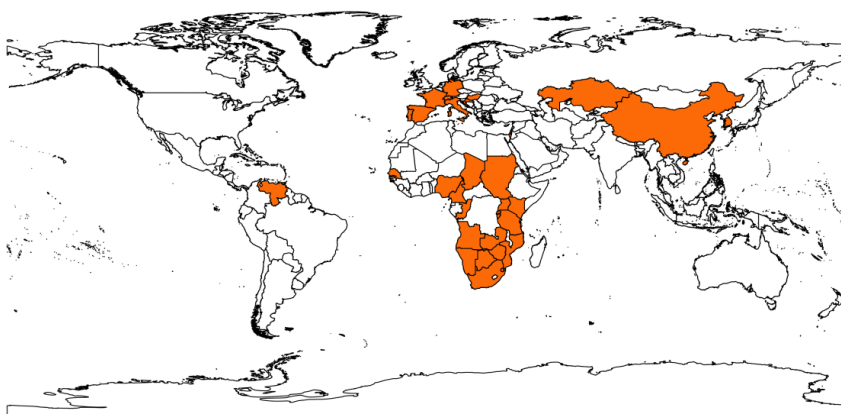
Outra forma de transmissão sugerida é a forma direta, de bovino a bovino; os quistos da derme podem ficar acidentalmente expostos, em situações como trauma ou rutura espontânea da superfície; para além disso, também existem quistos na mucosa nasal, que, ao ruturarem espontaneamente, libertam formas quísticas para a superfície, podendo estas ser disseminadas através das descargas nasais, servindo assim como uma fonte de infeção. No entanto, o facto de se tratar de uma doença de carácter sazonal contraria este e qualquer outro método de transmissão que não seja por via parentérica (Bigalke, 1968).

A infeção experimental de animais previamente imunossuprimidos com corticosteróides utilizando taquizoítos ou bradizoítos produz formas severas da doença (Dorchies *et al.*, 2007).

A Besnoitiose bovina é endémica no Sul da Europa (França, Espanha, Portugal), na África subsariana e na Ásia (Dorchies *et al.*, 2007) (Figura 9).

Figura 9 - Mapa mundial de distribuição de Besnoitiose bovina

(Fonte: Waap, 2015)



Em Portugal, os casos positivos encontrados na região Norte tiveram contacto anterior com a região do Alentejo; no entanto, não foi possível encontrar qualquer relação entre a região alentejana e os casos positivos encontrados no centro do país. Este facto sugere que a introdução de animais infetados nas explorações não deverá ser a única fonte de infeção; para além disso,

considerando que o Alentejo exporta bovinos para todas as regiões do país, sem qualquer teste para Besnoitiose antes da movimentação do animal, é intrigante o facto de esta doença não estar mais disseminada por outras regiões. No entanto, pensa-se que esta doença possa estar subdiagnosticada nas outras regiões portuguesas, dado que se trata de uma doença com sinais clínicos muito inespecíficos principalmente nas primeiras fases da doença, podendo ser confundida com outros diagnósticos diferenciais. Estes dados podem indicar que mesmo quando os animais infetados são introduzidos em explorações indemnes, a mera existência de insetos vetores não será suficiente para estabelecer um ciclo infeccioso. No entanto, põe-se a hipótese da existência de um ciclo de vida na natureza, no qual os bovinos têm o papel de hospedeiros acidentais (Franco & Borges, 1916; Olias *et al.*, 2011; Waap *et al.*, 2014).

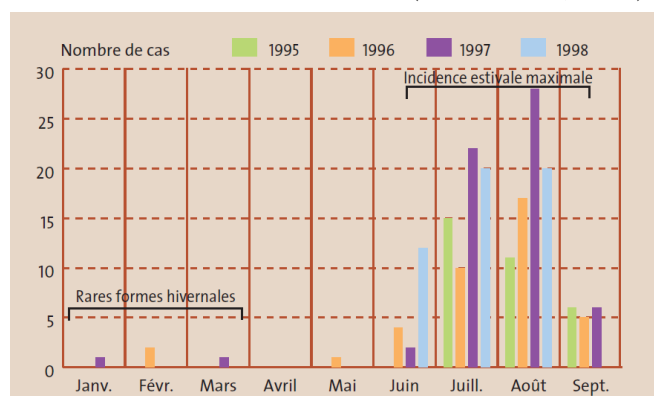
Em alguns estudos verificou-se que a seroprevalência da doença aumenta com a idade dos animais (Fernández-García *et al.*, 2010; Janitschke & Bigalke, 1984); a incidência da doença é muito baixa nos animais com menos de um ano e praticamente nula nos vitelos até ao desmame. A transferência passiva de anticorpos através do colostro das mães para os filhos poderá contribuir para explicar os raros casos de Besnoitiose nos vitelos (Shkap, Pipano, Marcus, & Krigel, 1994). Bigalke (1968) observou que a incidência clínica da doença era mais elevada nos animais com 3-6 anos; na Coreia do Sul, Lee *et al.* (1970) (citados em Waap, 2015) verificaram que a percentagem de animais com quistos na esclera era mais elevada nos animais com 5-8 anos, seguido da categoria > 9 anos e mais baixa nos animais com 2-4 anos. No entanto, a percentagem de casos de esclerodermia foi maior na categoria de 2-6 anos. Em França, o maior número de casos foi registado em animais com 2-4 anos (Alzieu *et al.*, 2007).

Epstein (1955) (citado em Bigalke, 1968), considerou que a Besnoitiose era mais comum na raça Afrikander, uma raça que se pensa ter sido importada de Portugal e da Índia no século XV, através das navegações portuguesas; sugere-se que essa raça tenha derivado da raça Alentejana, raça autóctone mais prevalente na região mais infetada de Portugal, o Alentejo. Na década de 80 esta parasitose apresentava maior incidência na raça Salers, no entanto, nos últimos anos, foram detetados casos noutras raças tais como Charolesa, Limousine e Mertolenga e em animais cruzados (Cortes *et al.*, 2003). Conclui-se, portanto, que não existe predisposição racial particular, sendo que todas as raças podem ser atingidas de igual modo (Alzieu *et al.*, 2007).

Há estudos que indicam uma maior incidência desta doença no sexo masculino (Goldman & Pipano, 1983); outros estudos indicaram precisamente o contrário; Bigalke (1968) não encontrou diferenças entre géneros relativamente à incidência desta doença. Considera-se, através da generalidade dos estudos, que ambos os sexos são igualmente suscetíveis à Besnoitiose (Bigalke & Prozesky, 2004).

Trata-se de uma doença com carácter sazonal, com incidência máxima entre os meses de Julho e Setembro (Figura 10). O período estival compreendido entre Junho e Outubro é um fator de risco, sobretudo para as vacadas transumantes, uma vez que nesta altura muitas vezes se agrupam rebanhos, mas também devido à maior prevalência de insetos picadores nesta altura, possíveis vetores da doença (Alzieu *et al.*, 2007).

Figura 10 - Sazonalidade dos casos clínicos de Besnoitiose em França, durante os anos de 1995 e 1998 (Alzieu *et al.*, 2007)



As vacadas aleitantes sedentárias, não transumantes, podem ser infetadas após a compra de animais portadores, ou através de insetos picadores que se infetaram em animais positivos de outra exploração, desde que esta estivesse a uma distância próxima. As vacadas leiteiras sedentárias raramente são afetadas por esta doença, exceto em casos epizooticos, em que podem aparecer até dez animais afetados, sem qualquer explicação (Dorchies *et al.*, 2007). Pensa-se que isto se deva às diferentes condições de manejo e não seja propriamente uma suscetibilidade de raças; a criação dos animais em extensivo e pastoreio comum leva a que haja um maior contacto com artrópodes e/ou animais silváticos. Também é na criação de bovinos de carne que se verifica uma maior importação de animais, no sentido de melhorar a produtividade das raças autóctones.

O facto de nas vacas infetadas cronicamente existirem anticorpos anti-*Besnoitia* em circulação pode ser um fator de risco na transmissão desta doença aos vitelos, devido à ingestão de colostro, embora isto não esteja provado; um estudo, realizado por Shkap *et al.* (1994), feito em vitelos recém-nascidos, filhos de mães cronicamente infetadas com a doença, permitiu mostrar que os vitelos aos quais foi colhida uma amostra de sangue antes da administração de colostro, eram negativos à Besnoitiose, enquanto que os vitelos aos quais já tinha sido administrado colostro, tinham anticorpos anti-*Besnoitia* no soro, sendo que estes títulos de anticorpos iam aumentando à medida que os dias iam passando, de acordo com uma maior ingestão do leite

materno; não se sabe, contudo, se estes anticorpos permitem proteger os vitelos de uma exposição natural ao parasita (Shkap *et al.*, 1994).

A transmissão venérea não está provada como sendo um método de transmissão da doença; num estudo recente, que incluiu sémen de dezassete touros infetados subcl clinicamente e de doze touros com infeção clínica, não foi encontrado qualquer DNA de *B. besnoiti* no sémen, o que poderá dar a entender que o sémen de touros com infeção crónica não constitui um fator importante na transmissão da doença (Esteban-Gil *et al.*, 2014 citado em Ryan *et al.*, 2016).

Estudos realizados em Israel, durante cerca de vinte anos, mostraram que touros importados a partir da Europa têm uma maior propensão a expressarem sinais clínicos de Besnoitiose do que touros nascidos no próprio país; este facto pode sugerir que a maioria destes animais, nascidos no local, adquirem uma proteção parcial, quando expostos a uma infeção por *B. besnoiti* no campo (Fayer, Andrews, Ungar, & Blagburn, 1989; Fiege, Klatte, Kollmann, Zahner, & Burger, 1992; Zu, Fang, Fayer, & Guarrant, 1992, citados em Shkap *et al.*, 1994).

Hornok *et al.* (2015) descobriram que não ocorre transmissão de Besnoitiose através das vias venérea, transplacentária, colostrar nem por carraças; contudo, o risco de transmissão é elevado quando os vitelos permanecem muito tempo com as mães e se os animais estiverem estabulados no mesmo local (mesmo que separados fisicamente).

Existem estudos que comprovam que vacas afetadas cronicamente, contendo múltiplos quistos, são uma fonte de infeção de Besnoitiose bovina (Shkap *et al.*, 1994). É muito provável que a proximidade e o contacto entre animais infetados e saudáveis tenha um papel fundamental na transmissão da doença (Bigalke, 1968; Frey *et al.*, 2013). A separação espacial de animais infetados por *B. besnoiti* e animais livres da doença, por uma distância mínima de vinte metros, pode minimizar o risco de transmissão do agente (Gollnick, Scharr, Schares, & Langenmayer 2015; Lambin *et al.*, 2010). O contato entre os animais tem de ser muito próximo para que a transmissão aconteça. Raramente se encontra Besnoitiose nas explorações vizinhas, o que poderá ser explicado pelo curto tempo de sobrevivência do parasita no vetor, e porque a distância se trata de um fator limitante para a transmissão através de artrópodes (Bigalke, 1968). Apesar de vários animais de laboratório, coelhos, ovelhas e cabras serem suscetíveis a infeção artificial por *B. besnoiti* (Bigalke, 1968), ainda não foram encontrados outros animais infetados naturalmente, para além dos bovinos (Jacquiet, Lienard, & Franc, 2010).

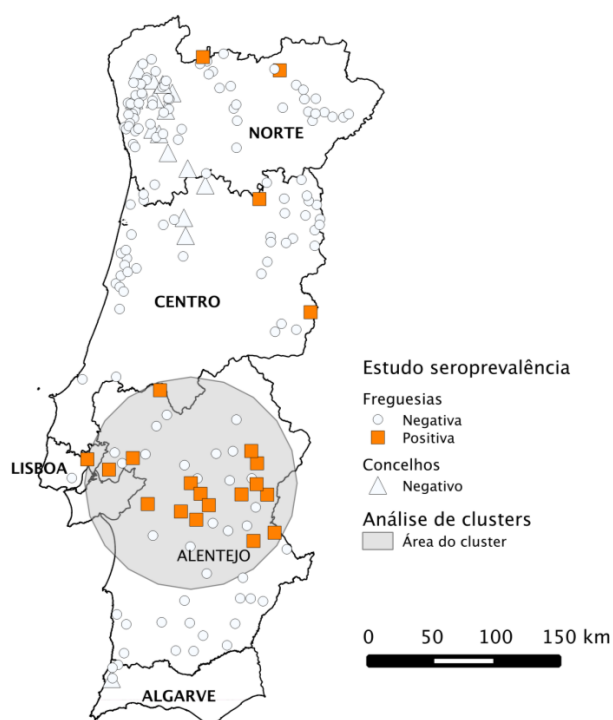
As características topográficas, climatéricas e da vegetação tais como a altitude, a temperatura e a precipitação, ao influenciarem a distribuição de artrópodes, influenciam também a distribuição das doenças por eles provocadas, tal como a Besnoitiose (Lambin, Tran, Vanwambeke, Linard, & Soti, 2010).

A administração de fármacos corticosteroides aumentou a suscetibilidade dos hamsters a infeção oral e parentérica por *B. besnoiti*, provocando um aumento no número de sinais clínicos (principalmente neurológicos) e mortalidade (Bigalke, 1968).

3.5.Prevalência em Portugal

O estudo de Waap *et al.* (2014) permitiu a atualização dos valores reais da prevalência de Besnoitiose no país: 5,1% (IC=3,1-7,8%) nas explorações, e 33% (IC=20,3-46,0%) de casos positivos dentro de cada exploração afetada pela doença. Segundo o mesmo estudo, em Portugal, foi obtida uma prevalência baixa de animais seropositivos em metade das explorações infetadas ($\leq 10,3\%$), enquanto que nas explorações mais severamente infetadas, a prevalência atingiu valores superiores a 72%; os valores baixos poderão ser explicados por duas razões: pela introdução recente da infeção ou pela transmissão lenta desta doença dentro da vacada, sendo que os valores elevados de prevalência na outra metade das explorações afetadas pode ser o resultado de um ciclo de transmissão mais bem sucedido ou de uma coabitação longa com a infeção (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição geográfica das freguesias e concelhos positivos em Portugal, (adaptado de Waap, 2015)



3.6.Sinais clínicos:

O estado clínico vai sendo cada vez mais característico à medida que a doença evolui. Após um período de incubação que pode ter a duração de seis a dez dias, surgem três fases sucessivas, facilmente distinguíveis: fase febril, fase dos edemas e fase de alopecia e de esclerodermia (Dorchies *et al.*, 2007), sendo que as duas primeiras correspondem à fase aguda da doença e a última à fase crônica (Basson *et al.*, 1970) (Tabelas 2 e 3):

3.6.1. Fase 1: estado febril

Na primeira fase, que pode ter a duração compreendida entre três e dez dias, surge uma síndrome febril, com sinais muito pouco específicos da doença tais como prostração, anorexia, taquicardia, taquipneia, movimentos ruminais mais lentos; ocorre hipertermia, apresentando o animal uma temperatura corporal entre os 40 e os 42 °C. A pele fica congestionada e muito sensível nas regiões do corpo cobertas por pele fina e na zona do pescoço. A inflamação aguda das mucosas ocular e da pituitária é responsável pelas secreções nasais que surgem por vezes e que podem variar entre serosas a seromucosas. À fase febril correspondem uma parasitemia intensa e a multiplicação dos taquizoítos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Durante esta fase o diagnóstico diferencial é difícil dada a baixa especificidade dos sinais clínicos (Dorchies *et al.*, 2007).

3.6.2. Fase 2: fase de anasarca

A primeira fase regride e a temperatura retal volta aos parâmetros normais o que leva muitas vezes a pensar na cura do animal. No entanto, a pele torna-se mais quente, espessa e dolorosa à palpação: aparecem edemas subcutâneos na zona da cabeça, barbelas, regiões de declive e na extremidade dos membros; surge adenomegalia e a marcha torna-se difícil devido à dor (Dorchies *et al.*, 2007); pode surgir hiperemia no focinho, na pele periorbital e no escroto (Bigalke & Prozesky, 2004); nas fêmeas, o úbere fica quente e doloroso, sendo que os tetos adquirem uma coloração violácea na base (Figura 12); os machos apresentam hipertrofia do escroto, podendo este estar edemaciado (Dorchies *et al.*, 2007); existe orquite e os testículos ficam sensíveis à palpação (Bigalke & Prozesky, 2004). No testículo, as lesões degenerativas e necróticas são causadas por vários fatores: a hipertermia, na primeira fase, vai originar um aumento dos níveis de glucose, à qual as células testiculares são muito sensíveis; pelas alterações circulatórias, de irrigação e de permeabilidade vascular, devido à multiplicação dos

taquizoítos nas células endoteliais dos vasos; pela multiplicação das formas proliferativas de *B. besnoiti* nas células de *Sertoli*, provocando alterações nas suas funções principais como estabilidade do epitélio seminífero, síntese de inibina, mediação dos esteróides na meiose, na barreira hematotesticular e como recetoras dos androgénios e da hormona folículo-estimulante (FSH) (Orgebin-Crist & Hochereau de Riviers, 1980; Ferreira *et al.*, 1982; Vandeplasseche, 1982 citados em Ferreira, 1985). A fertilidade das fêmeas parece não ser afetada por esta doença, apesar dos quistos também se desenvolverem no tecidos uterinos (Nobel *et al.* 1977, citados em Shkap *et al.*, 1994); estão descritos abortos nesta fase, embora não seja muito comum (Dorchies *et al.*, 2007).

Tanto nesta fase como na fase anterior pode surgir inapetência progressiva, culminando em anorexia nos casos mais severos; os animais apresentam-se apáticos e com fotofobia (Bigalke & Prozesky, 2004).

A segunda fase pode ter a duração de uma até duas semanas e corresponde à fase de proliferação dos taquizoítos (Dorchies *et al.*, 2007). A fase de anasarca passa muitas vezes despercebida (Bigalke & Prozesky, 2004).

3.6.3. Fase 3: fase de alopecia e esclerodermia

Esta fase surge geralmente três a quatro semanas após o aumento da temperatura correspondente à primeira fase da doença (Bigalke & Prozesky, 2004). Aqui agravam-se os edemas, a epiderme torna-se cada vez mais grossa lembrando a pele dos elefantes. A estação do animal torna-se cada vez mais difícil tal como a sua deslocação, e os animais perdem muito peso. Nesta fase, a maioria acaba por morrer, optando-se na grande parte das vezes pela eutanásia devido à dor e ao sofrimento existente, sendo que o bem-estar animal está comprometido nesta altura. No entanto, existem algumas exceções: alguns animais, nos quais a doença não é tão grave, sobrevivem, tornando-se animais cronicamente infetados: os sinais cutâneos predominam, com zonas de alopecia que correspondem a zonas de hiperqueratose escuras (focinho, tórax, pescoço, face interna das coxas, das dobras das articulações dos membros) (Dorchies *et al.*, 2007) (Figura 13). Por vezes surge um exsudado serosanguinolento que escorre ao longo da pele e que pode secar, formando escaras que podem, por vezes, ser uma porta para infeções secundárias. Os linfonodos superficiais apresentam-se invariavelmente maiores; pode surgir uma descarga nasal mucopurulenta, formando, por vezes, crostas, que podem tapar as vias respiratórias causando estridor (Bigalke & Prozesky, 2004).

O aparelho reprodutor dos machos é particularmente afetado, surgindo orquite e epididimite, devido à necrose seguida de calcificação; na maioria dos casos isto acontece bilateralmente, o

que conduz a aspermatogénese e a esterilidade, quase sempre irreversíveis. Nesta fase os quistos podem, também, ser encontrados na mucosa vaginal (*vestíbulum vaginae*) e no endométrio das fêmeas (Dorchies *et al.*, 2007) (Figura 14).

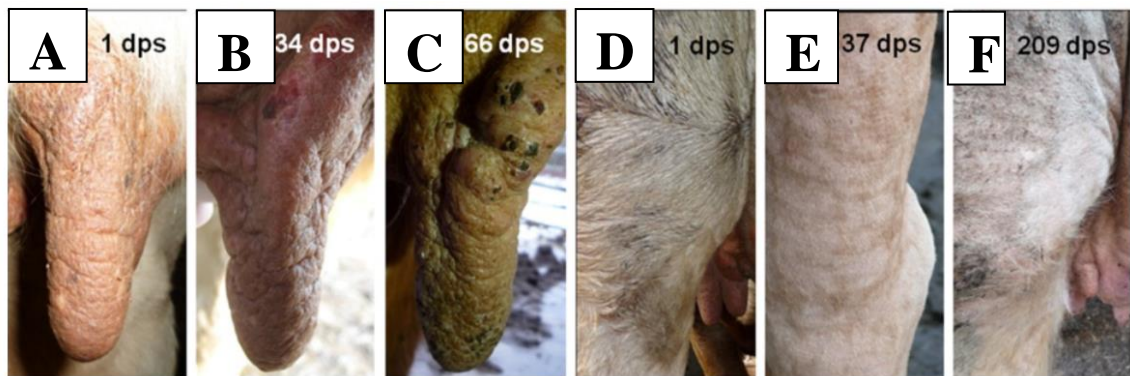
A esclerodermia pode ser explicada pelo desenvolvimento e pelo crescimento de numerosos quistos de grande dimensão na pele, especialmente nas papilas dérmicas e noutras partes do *stratum papillare*, e pela reação granulomatosa e fibrose em volta dos quistos, hiperqueratose e acantose; o enfarte e a enorme reação granulomatosa irão interferir com a circulação sanguínea e contribuir para o espessamento da pele e alopecia (Basson *et al.*, 1970). Existe uma correlação estreita entre o número de quistos subcutâneos e a severidade da doença (Bigalke & Naudé, 1962).

Apesar de a claudicação ou a relutância no movimento serem sinais clínicos comuns durante a fase aguda da Besnoitiose, foi descoberta há pouco tempo uma associação entre a fase crónica desta doença e a laminite crónica (Figura 14). Uma interferência dos quistos tecidulares com a *lamellae* epidérmica e com as veias dérmicas permite o desenvolvimento desta doença podal; uma distribuição de peso inapropriada no animal e alterações secundárias como a rotação da terceira falange e a redução na qualidade do estojo córneo conduzem à formação de lesões, como, por exemplo, úlceras da sola. Isto compromete o bem-estar do animal (Bigalke & Prozesky, 2004; Jacquiet *et al.*, 2010).

Nesta fase o diagnóstico é simples; para sua confirmação, é possível a identificação a “olho nu” e com o auxílio de uma luz, de quistos parasitários com o tamanho da cabeça de um alfinete, na conjuntiva da esclera (Figura 15); estes aparecem numa fase tardia, a partir da sexta ou sétima semana de evolução da doença. Caso estes quistos sejam evidentes e a hiperqueratose também, é sinal de que a intensidade das lesões nos órgãos internos já é elevada; os quistos contendo bradizoítos podem, assim, ser encontrados no tecido conjuntivo subcutâneo, na derme, nas fáscias e, por vezes, nas fáscias intermusculares.

Uma melhoria gradual na aparência do animal pode estar associada à degradação dos quistos e à subsequente diminuição do tamanho dos mesmos (Dorchies *et al.*, 2007). Isto poderá acontecer devido a uma reação imunitária em que títulos altos de anticorpos em circulação permitem um reconhecimento precoce do parasita e a destruição dos quistos, deixando presentes apenas algumas destas formas, permitindo a proliferação dos bradizoítos, permanecendo animais portadores do parasita (Frey *et al.*, 2013; Gollnick *et al.*, 2015).

Figura 12 - Alterações provocadas pela Besnoitiose ao longo do tempo. Lesões a nível dos tetos e dos membros (Fonte: Gollnick *et al.*, 2015)

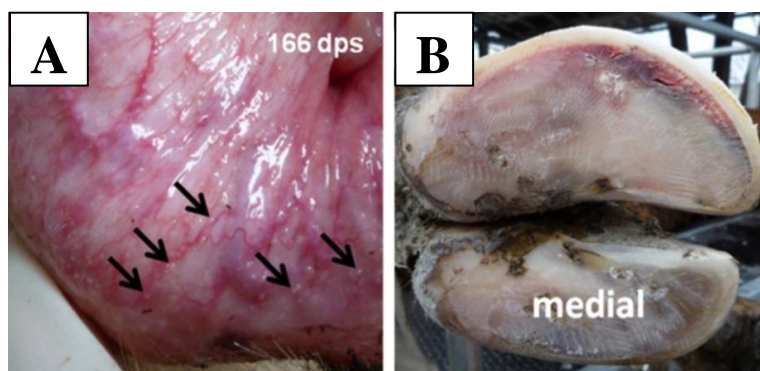


A – Teto clinicamente são; B – endurecimento palpável e lesões da pele abertas (5 semanas após A); C – nódulos intradérmicos e áreas epidérmicas encrustadas; D – pele de um membro posterior sem sinais clínicos; E – Pele da região társica irregular e liquenificada; F – pele de um membro posterior espessada e com alguma alopecia.

Figura 13 - Espessamento marcado, esclerodermia e eritema no membro de uma vaca com Besnoitiose (Fonte: Ryan *et al.*, 2015)

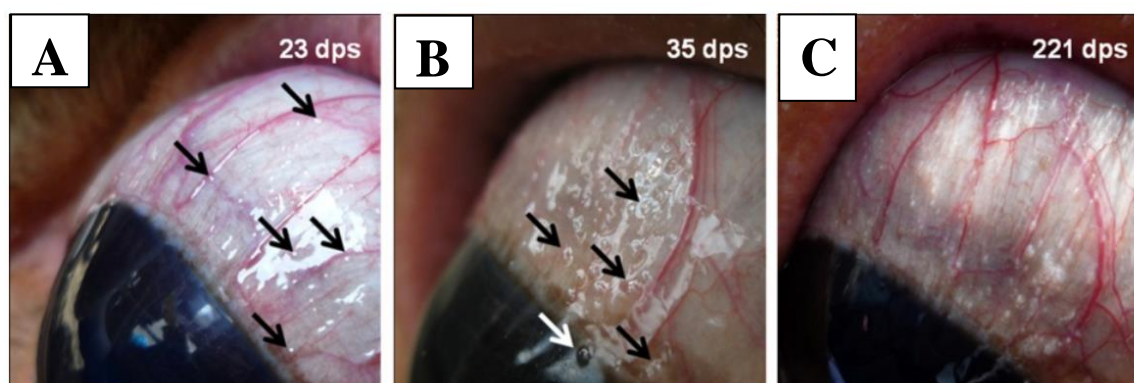


Figura 14 - Quistos de *Besnoitia besnoiti* na vagina e laminite crónica na sola de um animal infetado (Fonte: Gollnick *et al.*, 2015).



A – quistos parasitários presentes no *vestibulum vaginae*; B – unhas do membro posterior direito após apareagem; sinais de laminite crónica visíveis através do espessamento da linha branca e da hemorragia presente na unha lateral.

Figura 15 – Quistos parasitários na conjuntiva da esclera (Fonte: Gollnick *et al.*, 2015).



A – Início da fase crónica, quistos dificilmente detetáveis a “olho-nu”, necessidade de uso de luz para visualização dos quistos; B – duas semanas após A, quistos facilmente visíveis. C – Fase crónica avançada, quistos muito visíveis, com mais de 1mm de diâmetro.

Tabela 2 - Sequência temporal do aparecimento dos sinais clínicos (Fonte: Bigalke, 1981)

Fase	Sinais clínicos	Dias após-infeção
Aguda	Pirexia	3
	Inapetência	3
	Polipneia	3
	Hiperémia do focinho	4
	Astenia dos quartos posteriores	6
	Anasarca	7
	Temperatura normal	14
	Necrose da pele	21
	Desaparecimento da anasarca	23
Crónica	Alopécia	25
	Esclerodermia	25-35
	Linfadenopatia	29
	Quistos visíveis na conjuntiva da esclera	36

Tabela 3 - Desenvolvimento da patogenia na pele dos bovinos (Basson *et al.*, 1970)

Fase	Tipo de lesão	Dias após infecção
Aguda	Perivasculite, proliferação perivascular e vasculite	3-4
	Reconhecimento de <i>Besnoitia besnoiti</i>	6
	Proliferação de <i>Besnoitia besnoiti</i> no endotélio	7-10
	Edema	7
	Trombose	7
	Hipertrofia dos histiócitos	8
	Aparecimento de quistos – estágio precoce (15-25 µm)	11
	Estado quístico – células multinucleadas hipertrofiadas	16
	Desenvolvimento de quistos (30-100 µm)	16-25
	Final do estágio de edema	25
Subaguda	Quistos jovens (>100 µ)	26
	Quistos com septos	30
	Quistos necróticos	30-77
	Quistos quase maduros (300 µm)	70
Crónica	Quistos maduros (>300 µm)	71
	Parede quística avermelhada com HE	385

3.7.Imunidade

Segundo Hofmeyer (1945) (citado em Ferreira, 1985), a Besnoitiose só se contrai uma única vez; de facto, os animais curados permanecem portadores e desenvolvem uma imunidade que permanece enquanto os quistos se mantiverem viáveis, geralmente nos oito anos seguintes à infecção.

A resposta imunitária nos bovinos é principalmente celular, a partir dos linfócitos T, com a atuação das linfocinas que atuam e promovem a quimiotaxia, a inibição de migração e ativação dos macrófagos, conduzindo a reações de hipersensibilidade retardada (Hoff & Frenkel, 1974; Adams, 1976; Frenkel, 1977; Lindberg & Frenkel, 1977; Roit, 1980; Bach, 1981 [citados em Ferreira, 1985]), cuja evidência é visível através granulomas produzidos pelos quistos do parasita (Pissarra, 2008).

3.8.Diagnósticos diferenciais:

O diagnóstico clínico na fase febril é muito difícil uma vez que os sinais clínicos não são específicos (Dorchies *et al.*, 2007). A Besnoitiose deve ser considerada no diagnóstico diferencial de outras doenças nas quais ocorre febre aguda, tais como a Anaplasmoze (*Anaplasma marginale*) e Babesiose (Bigalke & Prozesky, 2004), IBR e, em menor grau, a Coriza Gangrenosa na sua fase inicial (contexto ovino-bovino, com sinais de edema corneal muito intenso) (Dorchies *et al.*, 2007).

Na segunda fase, o quadro clínico é relativamente característico, sendo que o clínico deverá descartar a presença de *Anaplasma phagocytophilum* (Erlíquiose), devido à presença de edemas na porção distal dos membros. O espessamento, o facto da pele se encontrar mais quente e o carácter geral do edema subcutâneo permitem estabelecer o diagnóstico (Dorchies *et al.*, 2007); no entanto, devem ser descartadas outras possibilidades tais como a insuficiência cardíaca e a Dermatose Nodular (Bigalke & Prozesky, 2004).

Já na última fase da doença, fase da esclerodermia, o prognóstico é unívoco devido à generalização e ao aspeto típico das lesões. No entanto, deve ser feito um diagnóstico diferencial com a hiperqueratose provocada pela sarna sarcótica (prurido muito intenso, ausente na Besnoitiose), com paraqueratoses hereditárias ou consecutivas a uma carência de zinco (placas mais localizadas, dolorosas à palpação) (Dorchies *et al.*, 2007), dermatofitose (doença de *Senkobo*, *ringworm disease*), infestação por piolhos, fotossensibilidade, intoxicação por mercúrio ou por ervilhaca (*Vicia spp.*) e dermatofilose (Bigalke & Prozesky, 2004).

Outras doenças que poderão ser diagnósticos diferenciais de Besnoitiose bovina são o vírus da Língua Azul (Jacquiet & Lienard, 2010), pasteurelose, infecção por *Mycoplasma bovis*, outros ácaros, deficiências de outros oligoelementos (Cortes, Leitão, Gottstein, & Hemphill, 2014) e linfoma cutâneo (Ryan *et al.*, 2016).

A presença de quistos oculares confirma o diagnóstico de Besnoitiose nesta fase (Dorchies *et al.*, 2007); em animais que não têm quaisquer outros sinais da doença, subclínicos, os quistos na conjuntiva da esclera (Bigalke & Prozesky, 2004) e/ou na região vulvar podem ser mesmo os únicos sinais da presença de *B. besnoiti* (EFSA, 2010; Fernández-García *et al.*, 2010).

3.9. Alterações hematológicas e bioquímicas

As alterações que surgem durante o estado agudo da Besnoitiose, tais como hemorragias, necrose ou lesões degenerativas (como por exemplo músculo e células hepáticas), juntamente com a ativação dos tecidos linfáticos, conduzem a alterações dos parâmetros laboratoriais associados a estas lesões. As hemorragias levam a alterações dos parâmetros eritrocitários; a necrose do músculo e do fígado pode conduzir a um aumento das enzimas específicas dos órgãos; alterações nos tecidos linfáticos ou inflamação multifocal podem afetar os parâmetros leucocitários. Num estudo realizado por Langenmayer, Scharr, Sauter-Louis, Schares, e Gollnick (2015), foi possível verificar as seguintes alterações em animais portadores de Besnoitiose bovina no estado agudo e subagudo: estado inflamatório agudo (ex: níveis elevados de globulinas no soro), condição geral alterada (ex: concentrações de bilirrubina alteradas) e lesões tais como necrose muscular (aumento da atividade das enzimas aspartato aminotransferase – AST – e creatina quinase – CK); já nos animais portadores de Besnoitiose na forma crónica foi possível observar alterações inflamatórias tais como hipergamaglobulinémia ou diminuição da contagem de eritrócitos.

3.10. Diagnóstico:

Existem vários testes de diagnóstico disponíveis para a Besnoitiose bovina tais como a citologia, histodoença, serologia e PCR (Bigalke, 1968; Cortes *et al.*, 2006; Alvarez-Garcia *et al.*, 2009; Cortes *et al.*, 2007; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009; Sanussi, 1991 [citados em EFSA, 2010]). Dentro das técnicas serológicas, os mais utilizados no diagnóstico da Besnoitiose são a IFAT, *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) e *Western-blot*; (Cortes *et al.*, 2006;

Shkap, Waron, Pipano, & Greenblatt, 1984; Janitschke *et al.*, 1984; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009, Neuman, 1972 [citados em Schares *et al.*, 2010]).

Foi desenvolvida um teste de aglutinação modificado (B-MAT) para o diagnóstico desta doença (Waap *et al.*, 2011). Também existem referências relativamente à técnica da fixação do complemento (Bigalke, 1966; Krasov & Omarov, 1975 citados em Shkap *et al.*, 1984), no entanto, não parece ser uma técnica muito promissora nesta área (Bigalke, 1966 citado em Shkap *et al.*, 1984).

É necessária alguma atenção no diagnóstico desta doença, uma vez que é possível a existência de animais com sinais clínicos, mas seronegativos em várias colheitas de sangue (Schares *et al.*, 2010). As razões pelas quais isto acontece não são conhecidas, sendo essencial realizar estudos no sentido de as entender melhor; no entanto, uma hipótese é a possibilidade de estes animais serem não-responsivos devido à imunotolerância que poderá ter ocorrido nos fetos expostos ao parasita antes do momento do parto; contudo, a possibilidade de transmissão vertical ainda não está bem descrita (Shkap *et al.*, 1994).

3.10.1. Citologia

Os taquizoítos de *B. besnoiti* que estão livres no sangue ou que se encontram nos monócitos podem ser demonstrados em esfregaços de sangue periférico bovino durante a primeira fase da doença, sendo, no entanto, escassos e difíceis de encontrar (Bigalke & Prozesky, 2004); também se pode fazer a sua pesquisa em esfregaços de gânglios linfáticos (Ferreira, 1985).

3.10.2. Histologia

Após biópsia de pele ou, preferencialmente, de uma raspagem da conjuntiva, o exame histológico permite evidenciar os quistos e bradizoítos. Estes quistos presentes na conjuntiva estão presentes na quase totalidade dos bovinos portadores da forma crónica da Besnoitiose (Figura 15) (Dorchies *et al.*, 2007).

3.10.2.1. Lesões macroscópicas:

Segundo um estudo realizado por Basson *et al.* (1970), alguns dos achados histopatológicos relativos a casos agudos de Besnoitiose são anasarca geral pronunciada, acompanhada por congestão subcutânea com múltiplos focos hemorrágicos disseminados e trombose subcutânea; a parede de muitos vasos sanguíneos de pequenas dimensões do tecido subcutâneo, cavidade nasal, laringe, da traqueia e dos membros podem apresentar pequenos focos hemorrágicos; as veias de maior calibre não sofrem grandes alterações. Pode verificar-se também edema e focos hemorrágicos nos hemonodos e nos linfonodos periféricos, tal como áreas localizadas de degeneração muscular e necrose. Os músculos também podem estar afetados, com áreas bem demarcadas de coloração rosada ou bege. O fígado pode apresentar-se alterado, havendo estase biliar e petéquias na vesícula biliar. Os pulmões podem encontrar-se edematosos e congestionados com algumas petéquias. As lesões presentes nos casos crônicos são idênticas às referidas anteriormente para casos agudos; em casos moderados podem ser encontrados alguns quistos nas veias das extremidades, e em menor quantidade, nas veias faciais (Basson *et al.*, 1970). No entanto, verifica-se que os quistos têm uma afinidade para as veias periféricas (McCully, Basson, Niekerk, & Bigalke, 1966). Com o aumento da severidade da doença, os quistos tornam-se mais difusos na sua distribuição e podem ser observados nos olhos, mucosa nasal, tecido subcutâneo, veias jugulares, músculos, fáscias intermusculares, bainhas tendinosas, parênquima testicular, endocárdio, válvulas cardíacas, entre outros locais (Tabelas 4 e 5). Nestes casos mais graves, verifica-se alopecia na zona da boca, olhos e orelhas, pescoço, metacarpos, coxas e zona da cauda (Basson *et al.*, 1970).

Tabela 4 – Exame histológico *post-mortem* de animais com infecção severa por *B. besnoiti* (Adaptado de Ryan *et al.*, 2016)

Tecido	Densidade do quisto	Grau de inflamação	Tipos de células inflamatórias presentes	Comentários
Pele (região distal dos membros, cauda, face, vulva)	+++	+++	Macrófagos +++ Eosinófilos ++	Quistos principalmente na região papilar da derme; hiperqueratose ortoqueratótica ligeira a moderada; congestão capilar; glândulas apócrinas dilatadas e ectáticas; edema na derme
Fáscia periarteriolar	++	+++	Macrófagos +++ Eosinófilos ++ Linfócitos + Células gigantes + Macrófagos +++	Quistos na túnica adventícia de veias

Língua	++	+	Macrófagos +++	Quistos principalmente na lamina própria Quistos ocasionais no epitélio
Olho	+	+	Macrófagos +++	Quistos na zona dorsal/ventral das junções córneo-esclerais e na conjuntiva da esclera.
Cavidade nasal	++	-	N/A	Epitélio hiperplásico Exocitose dos linfócitos Inflamação linfoplasmocítica ligeira
Epiglote	+++	+/-	Macrófagos +++	Quistos na lâmina própria e entre as glândulas mucosas;
Traqueia	++	+++	Macrófagos +++ Linfócitos ++	Quistos principalmente na lâmina própria; ulceração focal nas regiões com inflamação; células inflamatórias em apoptose.
Pulmão	+	-		Hiperplasia ligeira, multifocal do epitélio brônquico.
Pele do teto	++	++	Macrófagos +++ Eosinófilos +	Verrugas presentes: exofíticas, projeções epiteliais hiperplásicas e irregulares com hiperqueratose paraqueratótica.
Canal do teto	++	+	Macrófagos +++ Eosinófilos + Fibroblastos +	Ulceração focal do epitélio; inflamação geral de ausente a ligeira, infiltrado inflamatório periquístico escasso.
Corium da sola	+++	++	Macrófagos +++ Eosinófilos + Fibroblastos +	Apenas um único quisto com inflamação periférica
Periósteo	++	-	N/A	Quistos ocasionais nas paredes dos vasos sanguíneos
Cavidade medular	+	-	N/A	

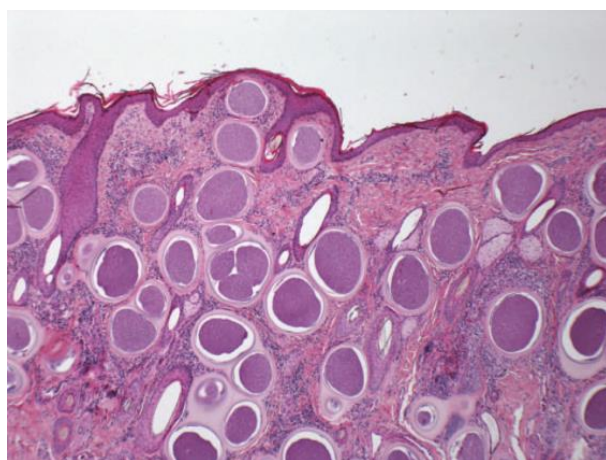
3.10.2.2. Lesões microscópicas:

Na fase aguda, um vasto número de células endoteliais encontra-se parasitado, contendo organismos de *B. besnoiti*; para além disso pode verificar-se perivasculite, proliferação vascular e vasculite, proliferação de *Besnoitia* no endotélio, edema, trombose, histiócitos hipertrofiados, quistos de pequena dimensão (15-100 µm), células multinucleadas hipertrofiadas, entre outros (Basson *et al.*, 1970). Macrófagos, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos podem surgir na parede dos vasos afetados (Bigalke & Prozesky, 2004). Com o aumento da cronicidade da doença, os quistos vão-se tornando maduros (> 300 µm); verifica-se necrose coagulativa dos tubos seminíferos com a presença de calcificação distrófica; os túbulos adjacentes encontram-se em aspermatogénese completa e podem encontrar-se células gigantes espermáticas multinucleadas (Basson *et al.*, 1970). A maioria dos quistos encontra-se dentro de uma fina cápsula de colagénio (Figura 16). Quando os organismos morrem, surge uma reação granulomatosa (Bigalke & Prozesky, 2004).

Tabela 5 - Tamanho dos quistos de *B. besnoiti* em função dos tecidos do animal (adaptado de Ryan *et al.*, 2016)

Tecido	Média do diâmetro dos quistos (µm)	Varição do tamanho dos quistos (µm)	Espessura da parede dos quistos (µm)	Varição do tamanho da parede dos quistos (µm)
Pele	232	195-340	20,4	15-37
Epiglote	192,5	135-250	19	15-25
Submucosa nasal	226,5	150-280	15,5	10-25
Submucosa traqueal	232	150-300	20,3	13-30
Submucosa do canal do teto	239,5	170-320	18,75	12,5-25
Corium da sola	248	185-300	22,4	18-30
Língua	179,5	125-220	21,7	14-40
Periósteo	127,5	100-250	15	12-30
Olho	190	140-235	19,37	8-30
Fáscia subcutânea	187,5	135-225	22	10-37,5
Pulmão	126	110-135	15,5	12,5-20
Total	198,27	100-340	19,08	8-40

Figura 16 - Fotomicrografia ilustrando múltiplos quistos de *Besnoitia besnoiti* na derme de um animal infetado (Fonte: Ryan *et al.*, 2015)



O parasitismo regular das veias de pequeno e médio calibre nos casos agudos de Besnoitiose, tal como a abundância de quistos nestas veias durante a fase crônica, sugerem que as lesões vasculares são de primeira significância nesta doença. A severidade das lesões vasculares primárias sugere que estas surjam principalmente devido a uma toxina que aumenta a permeabilidade vascular e que tem um efeito degenerativo e necrosante, particularmente notório nas veias (Basson *et al.*, 1970).

3.10.3. Serologia:

Os métodos de imunodiagnóstico utilizados têm como objetivo colocar em evidência os anticorpos séricos anti-*Besnoitia* produzidos nos bovinos infetados subclínicamente (Dorchies *et al.*, 2007). A serologia é também bastante útil para investigar a prevalência de animais que foram expostos a *B. besnoiti* numa determinada área, permitindo assim estabelecer programas de *follow-up* desses mesmos animais (Fernández-García *et al.*, 2010).

A serologia, pode ser aplicada também no diagnóstico dos casos clínicos, em substituição da histodoença, embora esta permaneça o *gold standard* (Waap, 2015).

A cinética dos anticorpos depende do teste sorológico usado, podendo explicar diferenças na performance da IFAT, ELISA e *Western-blot*. Os testes serológicos são realizados com conjugados bovinos anti-IgG totais (Lenfant *et al.*, 2014).

A IFAT é uma técnica com sensibilidade e especificidade de 89,6% e 99,6%, respetivamente (Waap *et al.*, 2014); tem algumas desvantagens, tais como os custos elevados da técnica (microscópio de fluorescência, conjugados anti-espécie, entre outros) e o facto de requerer uma especialização do pessoal; é uma prova demorada, sendo, por isso, pouco prática no diagnóstico de grandes populações (Waap, 2015). Trata-se de uma técnica que permite confirmar a seropositividade de soros diagnosticados como “duvidosos” com outras técnicas, apesar da subjetividade da interpretação dos resultados (Lenfant *et al.*, 2014). Com a IFAT, os anticorpos são detetáveis 10 dias após inoculação intravenosa e 22 dias após inoculação subcutânea de parasitas (Janitschke & Bigalke 1984).

A ELISA é uma técnica que pode ser realizada facilmente sendo útil para o diagnóstico e para investigações epidemiológicas de infeção por *B. besnoiti* em bovinos. Permite obter um panorama geral da doença. A técnica é particularmente vantajosa para pesquisas de campo (Shkap *et al.*, 1984). A técnica ELISA tem como vantagens o facto de não requerer uma grande quantidade de reagentes, sendo que centenas de soros podem ser testados em apenas um dia, podendo o teste ser automatizado (Janitschke & Bigalke, 1984).

O *immunoblot* é uma técnica com uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 90,3% em bovinos tanto com sinais clínicos como infetados subclínicamente (Schaes *et al.*, 2010). É usado, sobretudo, para confirmação de casos positivos às técnicas referidas anteriormente (Waap, 2015). Permite detetar falsos negativos ao teste do IFAT uma vez que se baseia na extração total dos taquizoítos, incluindo os produtos de excreção-secreção, enquanto que a técnica de IFAT deteta apenas anticorpos contra antígeno de superfície do parasita (Lenfant *et al.*, 2014).

3.10.4. Diagnóstico molecular - PCR:

Através de biópsias cutâneas é possível diagnosticar Besnoitiose por RT-qPCR (reação de cadeia pela polimerase em tempo real), com base nas sequências ITS-1. Esta técnica permite detetar a presença de um parasita num volume de apenas 200 µg de biópsia. Trata-se de uma técnica quantitativa (Dorchies *et al.*, 2007). Através da RT-qPCR, os parasitas são detetáveis 1 a 3 dias depois do início da fase febril (Schares *et al.*, 2013).

Existe um kit comercial para o diagnóstico de Besnoitiose disponível em França que se baseia no RT-qPCR e utiliza pele ou sangue total (Adiagene, 2016).

3.10.5. Teste de aglutinação direta modificado (B-MAT)

O teste de aglutinação direta modificado baseia-se na aglutinação de parasitas tratados com formalina na presença de soro que contém anticorpos IgG específicos; foi desenvolvido pela primeira vez em 1959 por Fulton & Turk, para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii* em humanos. Como vantagens tem as altas especificidade e sensibilidade, baixo custo e a aplicabilidade em larga escala; para além disto, não necessita do uso de soro anti-espécie de um hospedeiro secundário específico, permitindo testar uma grande variedade de espécies, que poderão estar implicadas no ciclo de vida do parasita, tornando-se assim este teste muito interessante em termos de estudos epidemiológicos (Waap *et al.*, 2011).

3.11. **Tratamento:**

Leitão (1948) (citado em Pols, 1960), sugeriu como tratamento da fase crónica da Besnoitiose a administração de três injeções de 30 ml de uma solução de formalina, com três dias de intervalo; já Herin (1952) (citado em Pols, 1960), sugeriu uma administração de uma única injeção intravenosa de 30 ml de uma colusão de formalina a 1%, durante a fase aguda da doença; para situações crónicas sugeriu a administração de injeções intravenosas de 20 a 40 ml de iodo de Lugol com quatro a sete dias de intervalo, sendo que cinco injeções eram, normalmente, suficientes. Não foram feitas avaliações clínicas dos resultados dos tratamentos anteriormente descritos, no entanto, ambos os investigadores expressaram a opinião de que estas formas de tratamento tinham influenciado positivamente o curso da doença naqueles animais (Pols, 1960).

Considera-se que não existe tratamento disponível para a Besnoitiose (Bigalke & Prozesky, 2004). Devem ser administrados fármacos antimicrobianos associados a uma terapia anti-inflamatória e diurética, de modo a controlarem-se os efeitos secundários da doença. O tratamento de escolha baseia-se na utilização de sulfamidas, numa dose superior à dose habitual, como por exemplo sulfadimerazina na dose de 150-200 mg/kg e sulfadimetoxina na dose de 60-80 mg/kg, aconselhando-se a via endovenosa muito lenta, com duração nunca inferior a cinco dias (Dorchies *et al.*, 2007). Outros antibióticos alternativos pertencem à classe das tetraciclina (Bigalke & Prozesky, 2004).

São também utilizados anti-inflamatórios não esteróides (AINES) durante a fase febril ou na fase dos edemas; os anti-inflamatórios esteróides são usados normalmente em associação com diuréticos tiazídicos. Os diuréticos de urgência, como por exemplo a furosema, são indicados apenas nos picos de hipertermia da fase febril (Dorchies *et al.*, 2007).

Como tratamento de suporte deve-se optar por uma alimentação nutritiva, água *ad libitum* e manutenção em instalações com sombra e cama confortável; no entanto, apesar de poder haver uma melhoria no estado clínico do animal, o problema mantém-se na exploração, sendo uma fonte de infeção para outros animais, e por isso, o animal deve ser separado dos outros e abatido o mais rápido possível (Bigalke & Prozesky, 2004).

3.12. Medidas de prevenção e profilaxia:

Na África do Sul e em Israel foram desenvolvidas vacinas vivas atenuadas à base de taquizoítos produzidos em culturas de células. A vacina utilizada na África do Sul foi preparada com um isolado de gnu (Bigalke *et al.*, 1974) e a de Israel com um isolado bovino (Pipano, 1997).

A administração é feita por via subcutânea, sendo que uma dose protege os animais durante quatro anos, devendo ser feita uma revacinação dois anos depois; esta vacina não protege o animal de infeções subclínicas (Bigalke *et al.*, 1974). Este procedimento não deixa de resultar em infeção e na formação de quistos nos animais inoculados, sendo também imprecisa ou duvidosa a utilidade da vacina quando aplicada em programas vacinais. O uso de vacinas vivas atenuadas tem o inconveniente de se poder introduzir artificialmente o parasita nas explorações indemnes, com o risco da sua disseminação através de animais portadores; isto é especialmente importante no caso de *B. besnoiti*, uma vez que o seu ciclo de vida e o modo de transmissão não são, ainda, conhecidos (Bigalke, 1981; Bigalke, Basson, McCully, & Bosman, 1973).

3.12.1. Profilaxia sanitária em zonas endêmicas

Os tabanídeos e as moscas-do-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) são os principais insetos que devem ser controlados. A profilaxia contra estes insetos faz-se sobretudo através de pulverizações, sprays, *pour-ons* ou através de brincos auriculares inseticidas. Deve assegurar-se a presença permanente e prolongada de um inseticida na pele. Os piretróides são as substâncias ativas mais utilizadas tanto em pulverizações como nas soluções *pour-on*, devendo ser aplicadas, no mínimo, a cada três semanas.

Considerando a extrema gravidade da Besnoitiose e a ausência de uma estratégia vacinal eficaz, a prioridade deve ser uma profilaxia sanitária, através da eliminação sistemática de todos os animais doentes e dos infetados (portadores latentes) (Dorchies *et al.*, 2007).

A eliminação sistémica de animais cronicamente infetados, após exame da conjuntiva escleral, numa vacada fechada ou numa zona endémica, provou ser eficaz na diminuição de novas infeções no rebanho; também a separação dos animais em lotes de animais serologicamente positivos e negativos mostrou eficácia (Bigalke, 1968; Jacquiet *et al.*, 2010).

3.12.2. Profilaxia em regiões indemnes

Deve ser feita uma análise de risco (ex. proveniência dos animais, modo de agrupamento, entre outros), e, em caso de dúvida, um controlo serológico aos animais comprados, a fim de se assegurar a não introdução de animais doentes. Numa vacada considerada indemne, no caso de aparecer um caso clínico, deve-se proceder à sua eutanásia imediatamente.

No entanto, uma vez que se trata de uma doença cuja epidemiologia ainda não é bem conhecida, não é possível determinar com toda a certeza quais as medidas preventivas corretas a aplicar (Dorchies *et al.*, 2007).

3.13. **Importância económica da Besnoitiose**

A Besnoitiose é uma doença que tem um forte impacto nas explorações infetadas, uma vez que conduz à esterilidade permanente dos machos devido à atrofia, esclerose e necrose dos testículos (Bigalke & Prozesky, 2004; Mehlhorn *et al.*, 2009), pode provocar abortos nas fêmeas e diminuição da produção de leite (Pols, 1960); no matadouro, para além de conduzir à perda de qualidade e à diminuição no rendimento da carcaças, muitas poderão ser rejeitadas devido à presença de quistos nas fâscias, no tecido conjuntivo intermuscular e em diversos órgãos

(Bigalke & Prozesky, 2004; EFSA, 2010; Frey *et al.*, 2013) , havendo também a rejeição das peles (Pols, 1960). Os longos períodos de convalescença desta doença predispõem os animais a infecções secundárias e, consecutivamente, à sua morte (Njagi, Entzeroth, Nyaga, & Musoke, 2004).

4. Estudo

4.1. Material e métodos

4.1.1. Caracterização da exploração

O estudo foi realizado numa exploração da região do Ribatejo, cujos principais objetivos são a engorda de animais para abate e a venda de reprodutores de raça pura com alto valor genético. Nesta exploração encontram-se cerca de 2000 animais de várias raças tais como Limousine, Salers, Charolês, Blonde d'Aquitaine e animais cruzados.

A exploração aposta fortemente na seleção e melhoramento genético dos seus animais, utilizando como recursos para tal, a inseminação artificial e, com menos frequência, a transferência de embriões. Por vezes, para que haja uma renovação do efetivo, são importados animais de outros países, sobretudo de França. As vacadas são geralmente divididas em dois grupos, conforme o seu mérito genético, capacidades reprodutivas e temperamento, decidindo-se assim o seu futuro na exploração: reprodução ou engorda.

Os partos são distribuídos sobretudo por duas alturas do ano: Primavera e Outono.

Trata-se de uma exploração em regime extensivo, sendo que os animais se encontram nas diversas pastagens, agrupados, principalmente, conforme a sua raça. O manejo, tanto em termos nutricionais como profiláticos é muito idêntico para todos os animais, e as áreas de pasto são contíguas, podendo mesmo ser partilhadas. O protocolo vacinal aplicado na exploração é o mesmo para todo o efetivo, sendo os animais vacinados pela primeira vez ao desmame, e a revacinação feita anualmente, geralmente na altura da tuberculinização. Nos adultos, são usadas vacinas para enterotoxémias, IBR e BVD; nas novilhas e nas vacas é geralmente administrada a vacina para proteção das diarreias neonatais nos vitelos (provocadas por Rotavírus, Coronavírus e *Escherichia coli*), dois meses antes da altura prevista para o parto. A vacinação nos vitelos é efetuada contra IBR, BVD, Parainfluenza-3, Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e enterotoxémias. É também nesta altura que é feita a desparasitação de todo o efetivo, com um antiparasitário cujas substâncias ativas são Ivermectina + Clorsulon, de forma subcutânea.

Esta exploração foi escolhida para este estudo uma vez que nela têm aparecido alguns casos clínicos nos últimos anos, todos eles confirmados laboratorialmente. Posto isto, pretendia-se efetuar uma análise para perceber melhor qual a origem da doença e quais os fatores de risco associados à mesma para ser possível, de alguma forma, alterar o manejo, de modo a evitar a entrada de mais animais portadores da doença e a disseminação da mesma.

Uma das condições para a elaboração desta dissertação foi o sigilo, pelo que o nome da exploração nunca será referido ao longo do texto.

4.1.2. Animais testados

Os animais cujo sangue foi recolhido com a finalidade única deste estudo foram selecionados aleatoriamente; o sangue dos animais adultos foi colhido aproveitando a ida do animal à manga para outros procedimentos (inseminação, diagnóstico de gestação, tratamento, entre outros), sendo que o sangue dos vitelos foi colhido no dia em que estes foram à manga para pesagem e inscrição no livro genealógico da sua raça (sendo, por este motivo, todos os vitelos incluídos no estudo, de raça pura e nenhum cruzado).

Alguns dos soros testados foram obtidos no âmbito do plano nacional de erradicação da brucelose, tendo sido recolhidos no Laboratório de Medicina Veterinária – LMV, em Santarém, com autorização do proprietário da exploração e da Direção Geral de Agricultura e Veterinária (DGAV).

O sangue foi obtido na veia coccígea, utilizando-se para tal, tubos de plástico e agulhas hipodérmicas de 18 G.

Foram analisados 450 soros de bovinos; destes animais, 362 eram do sexo feminino, sendo 88 do sexo masculino (Tabela 6). Destes bovinos, 366 eram animais adultos (idade superior a um ano), sendo 84 vitelos (até 1 ano de idade) (Gráfico 1). Pertenciam a quatro raças puras mas também foram estudados animais cruzados: 4 da raça Blonde d'Aquitaine, 96 de raça Charolesa, 52 de raça Limousine, 69 de raça Salers e 229 cruzados (Gráfico 2). Cerca de 82,6% dos animais tinha origem na própria exploração, sendo que 17,4% eram animais provenientes de outras explorações (1,8% importados de França e 15,6% vindos de outras explorações portuguesas) (Tabela 7).

Nenhum dos animais apresentava sinais clínicos compatíveis com Besnoitiose.

Tabela 6 - Distribuição de animais por sexo

Sexo	Quantidade	%
F	362	80,44
M	88	19,56

Tabela 7 - Distribuição dos animais conforme a origem

Origem	Exploração	Fora
Nº de animais	371	78
Percentagem (%)	82,6	17,4

Gráfico 1 - Distribuição dos animais conforme a idade

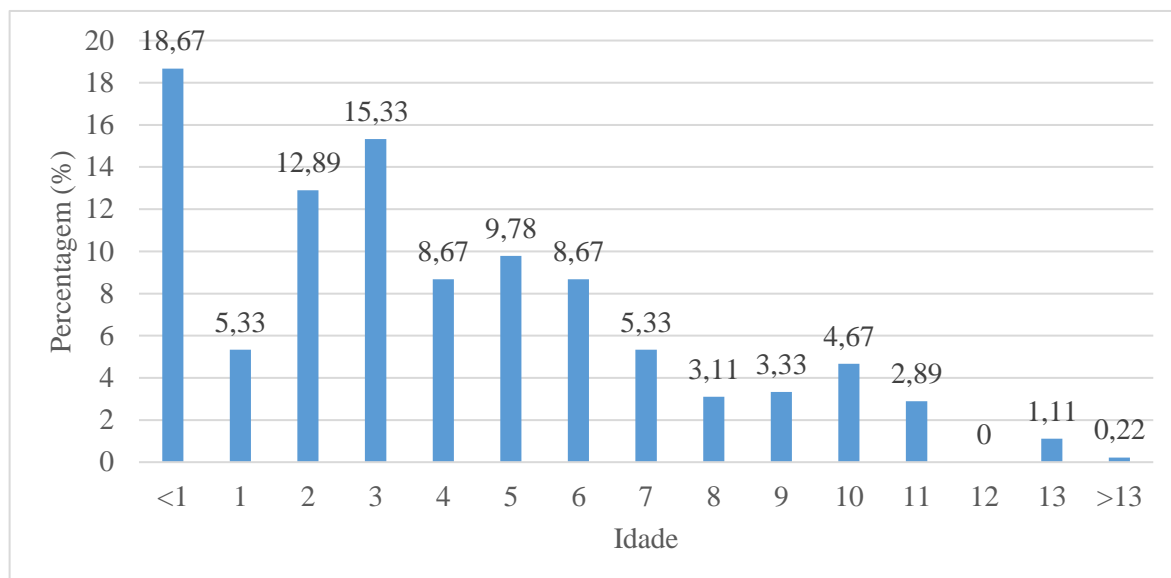
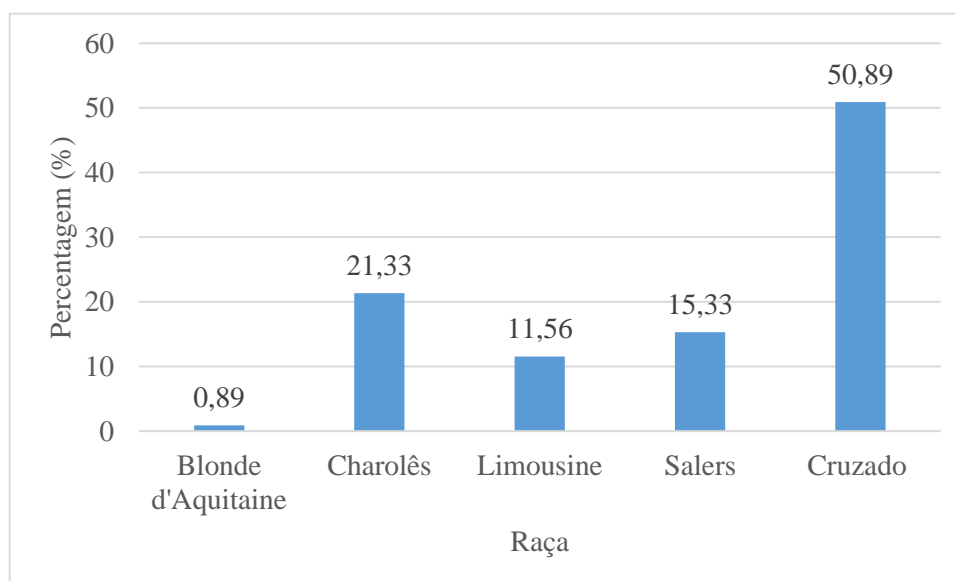


Gráfico 2 - Distribuição dos animais conforme a raça



4.1.3. Método laboratorial

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados pela autora da dissertação exceto a produção dos taquizoítos que foram usados como antigénio nas lâminas de IFAT, uma vez que este procedimento levaria alguns dias (ver secção 4.1.3.2.) e toda a parte laboratorial foi intercalada com os dias de estágio no campo.

4.1.3.1. Centrifugação

Após um período de refrigeração de aproximadamente 24 horas, todas as amostras de sangue foram sujeitas a centrifugação (2000 rpm durante 10 minutos) para obtenção de soro. Os soros obtidos foram colocados em tubos *Eppendorf* (Figura 17), devidamente numerados, de acordo com a ordem dos animais aos quais foi colhido o sangue. Foram posteriormente congelados a -18 °C, permitindo assim que o diagnóstico laboratorial fosse feito mais tarde. Os soros provenientes do LMV, cerca de 300, uma vez que vinham congelados, foram sujeitos a descongelação, colocados nos respectivos tubos *Eppendorf* e analisados imediatamente.

Figura 17 - Soros de bovino contidos em *eppendorfs*, obtidos após centrifugação das amostras de sangue (Fonte: original)

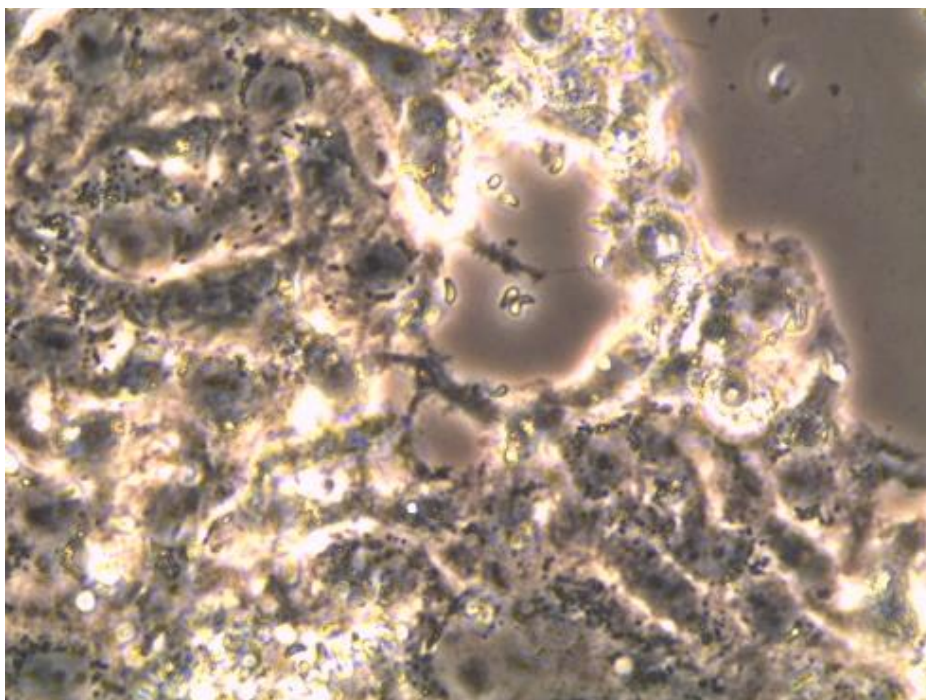


4.1.3.2. Produção de taquizoítos

O isolado de *B. besnoiti* (isolado Bb1Évora03) utilizado na preparação da suspensão de antígeno para o revestimento das lâminas para a prova de IFAT foi obtido de um bovino naturalmente infectado (Cortes *et al.*, 2006). Os parasitas foram preservados em azoto líquido e descongelados para efeitos do presente trabalho. Os taquizoítos foram propagados por passagem contínua em células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com penicilina, estreptomicina, 1 mM glutamina e soro fetal bovino (SFB). A inoculação foi realizada em monocamadas de células Vero em meio DMEM suplementado com 10% SFB, em frascos de cultura T75 ou T175, consoante a necessidade de produção de antígeno, utilizando respetivamente 15×10^6 ou 35×10^6 taquizoítos/ml. As culturas foram mantidas a 37 °C numa incubadora de dióxido de carbono (CO₂), em atmosfera húmida, com 5% de CO₂. Após 48

horas, substituiu-se o meio dos frascos inoculados por meio DMEM com 2% SFB. As culturas infectadas foram observadas diariamente ao microscópio invertido com contraste de fase, para monitorizar o crescimento de *B. besnoiti* (Figura 18). O sobrenadante foi colhido ao fim de cerca de 5 dias pós-inoculação e verificado em colunas de celulose *Whatman CF 11* para a preparação das lâminas de IFAT.

Figura 18 - Taquizoítos de *Besnoitia besnoiti* em cultura de células Vero
(Fonte: original)



4.1.3.3. Controlos

Foram usados vários controlos: um negativo, um positivo médio e um positivo forte. Os controlos positivos pertenciam a animais com sinais clínicos de Besnoitiose, positivos à histodoença e à IFAT. O controlo negativo foi obtido de um animal proveniente de uma zona geográfica sem casos de Besnoitiose descritos, sendo negativo à prova do B-MAT.

4.1.3.4. Teste de imunofluorescência indireta para deteção de anticorpos anti-*Besnoitia* – IFAT

Foram usados como antígenos taquizoítos de *B. besnoiti* purificados a partir das culturas de células atrás referidas. As lâminas de imunofluorescência indireta foram sensibilizadas conforme descrito por Shkap *et al.* (2002). Os taquizoítos purificados foram lavados, uma vez,

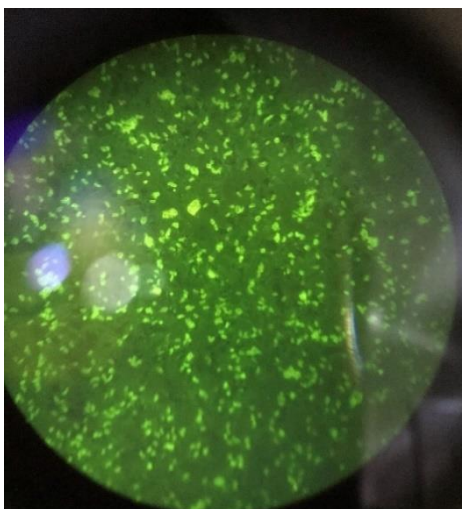
em PBS, e fixados em paraformaldeído e refrigerados sobre gelo, durante 30 min. Depois de três ciclos de lavagem, os parasitas foram contados numa câmara de *Neubauer* e diluídos em PBS para uma concentração de 2×10^6 taquizoítos/ml. Foram colocadas gotas de 6 µl de suspensão de antígeno em lâminas de microscopia ótica, com o auxílio de uma pipeta multicanal. Cada lâmina ficou com um total de 12 gotas, distribuídas por duas linhas. As lâminas foram secas a 37 °C e fixadas em acetona refrigerada a -20 °C, durante 10 min. As lâminas sensibilizadas foram armazenadas a -30 °C até à sua utilização.

No dia da técnica, as lâminas foram retiradas do congelador, e deixadas à temperatura ambiente durante aproximadamente 5 a 10 minutos. Foi feita uma circunferência em volta de cada poço da lâmina, com um marcador azul. As lâminas foram numeradas de acordo com os números dos *eppendorfs* onde estavam contidos os soros dos animais do estudo.

A pesquisa de anticorpos anti-*B. besnoiti* foi realizada com uma diluição *cut-off* de 1:256 (Shkap *et al.*, 2002); distribuiu-se 15 µl do soro diluído em cada poço das lâminas, que foram posteriormente incubadas em câmara húmida a 37 °C durante 30 minutos; as lâminas foram depois lavadas com PBS durante dez minutos e secas com um secador. Depois deste processo, foram aplicados 15 µl de conjugado antiovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Serotec AA123F), diluído 1:200 em PBS, em cada poço. Nesta solução estava contido também Azul de *Evans*, numa diluição de 1:100, para permitir uma observação mais fácil dos parasitas ao microscópio de fluorescência. As lâminas foram novamente incubadas em câmara húmida durante 30 minutos e lavadas como anteriormente referido. Às lâminas, já secas, foi adicionado meio de montagem, composto por 50% de glicerina e 50% de tampão PBS pH 9,4; foi colocada uma lamela por cima de cada uma. A leitura dos resultados foi realizada num microscópio de fluorescência, com uma ampliação de 400 X (Anexo 1).

Foram consideradas reações positivas todas as amostras que revelaram fluorescência periférica total, sendo consideradas como negativas as que apresentaram fluorescência apical, parcial ou ausente (Figura 19).

Figura 19 - Observação da fluorescência de um caso positivo de Besnoitiose ao microscópio ótico com luz ultravioleta (Fonte: original)



4.1.4. Recolha de dados

A recolha de dados foi efetuada na exploração, recorrendo ao programa Isacarnes, uma base de dados onde se encontram as informações referentes a cada animal, desde a sua raça, origem, data de nascimento, dados dos pais, ações profiláticas, doenças, entre outros. Foram obtidas várias listagens, de acordo com as raças dos animais, para um mais fácil acesso a todos os dados necessários ao estudo. Foram registadas as informações no *Excel (Office 2016)* (Figura 20), numa tabela cujas variáveis eram as seguintes: Identificação do Animal (SIA), Raça, Tipo (adulto/vitelo), nº de casa, data de nascimento, idade, idade por classes, marca de exploração, sexo, nº de *eppendorf* respetivo (no qual era colocado o soro após centrifugação da amostra de sangue), resultado (positivo/negativo), SIA da mãe, raça da mãe, nome do pai, raça do pai, origem (nascido na exploração/nascido fora da exploração) e touros com os quais teve contacto.

4.1.5. Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico R (para *Windows 10*) (R Core Team, 2018). Um dos testes usados foi o teste de qui quadrado, para avaliar a associação existente entre duas variáveis qualitativas; considera-se que um evento é estatisticamente significativo quando o valor-p é menor ou igual a 0,05 (valor estipulado no início do estudo, para um intervalo de confiança de 95%). Este teste também permite calcular o risco relativo de um acontecimento em relação a outro (*odds ratio*). Foi usado o teste de *Fisher* quando um dos valores esperados numa célula era inferior a 5, uma vez que, neste caso, o teste de qui-quadrado é inválido (Correa, Queiroz,

& Trvisan (n.d.); Petrie & Watson, 2006a). Recorreu-se, também, à regressão logística no sentido de se estabelecer uma relação entre uma variável dependente e um conjunto de variáveis independentes (Petrie & Watson, 2006a). Para o cálculo das prevalências reais foi utilizado o programa EpiTools (Sergeant, ESG, 2018).

4.2.Resultados

4.2.1. Prevalência real

De acordo com a sensibilidade e especificidade do teste IFAT, foi possível calcular a prevalência real de animais positivos neste estudo, sendo esta de 18,58%, para um IC 95%: (15,02 – 22,76%) (Anexo 2). O mesmo foi efetuado em relação a vitelos e a animais adultos. Para os primeiros, obteve-se uma prevalência real de casos positivos de 3,71% para um IC 95%: (1,05 – 10,97%) (Anexo 3); em relação aos adultos, os valores observados são de 21,94% para um IC 95%: (17,72 – 26,85%) (Anexo 4).

4.2.2. Resultados conforme a raça

De acordo com a raça dos bovinos em estudo, foram obtidas as seguintes percentagens de casos positivos: Blonde d'Aquitaine – 50%; Charolês – 12,5%; Limousine – 15,4%; Salers – 47,8% sendo que nos animais cruzados a positividade foi de 9,2%. Obteve-se um valor-p de $1,55 \times 10^{-12}$ ($< 0,01$) para o fator raça, sendo este estatisticamente significativo, e, portanto, pode considerar-se que a raça é um fator de risco para a Besnoitiose.

Tabela 8 - Frequência dos resultados em função da raça

	Negativo	Positivo
Blonde	2 (50%)	2 (50%)
Charolês	84 (87,5%)	12 (12,5%)
Cruzado	208 (90,8%)	21 (9,2%)
Limousine	44 (84,6%)	8 (15,4%)
Salers	36 (52,2%)	33 (47,8%)

4.2.3. Resultados conforme a idade

A distribuição de animais positivos conforme a idade pode ser verificada na tabela 9; o gráfico 3 mostra a relação entre o número de animais positivos e o número de animais testados, conforme a idade, enquanto que o gráfico 4 representa a prevalência de positivos conforme a idade, isto é, número de positivos da idade X/nº animais da idade X testados.

Comprovou-se haver uma prevalência significativamente maior de positividade nos animais mais velhos ($p < 0,01$), sugerindo que a idade é um fator de risco para a Besnoitiose.

Tabela 9 - Frequência dos resultados em função da idade

	Negativo	Positivo
<1	80 (95,2%)	4 (4,8%)
1	11 (45,8%)	13 (54,2%)
2	44 (75,9%)	14 (24,1%)
3	63 (91,3%)	6 (8,7%)
4	30 (76,9%)	9 (23,1%)
5	43 (97,7%)	1 (2,3%)
6	32 (82,1%)	7 (17,9%)
7	23 (95,8%)	1 (4,2%)
8	12 (95,7%)	2 (14,3%)
9	11 (73,3%)	4 (26,7%)
10	14 (66,7%)	7 (33,3%)
11	8 (61,5%)	5 (38,5%)
12	0	0
13	3 (60,0%)	2 (40,0%)
>13	0	1 (100%)

Gráfico 3 - Relação entre o número de animais positivos e de animais testados conforme a idade

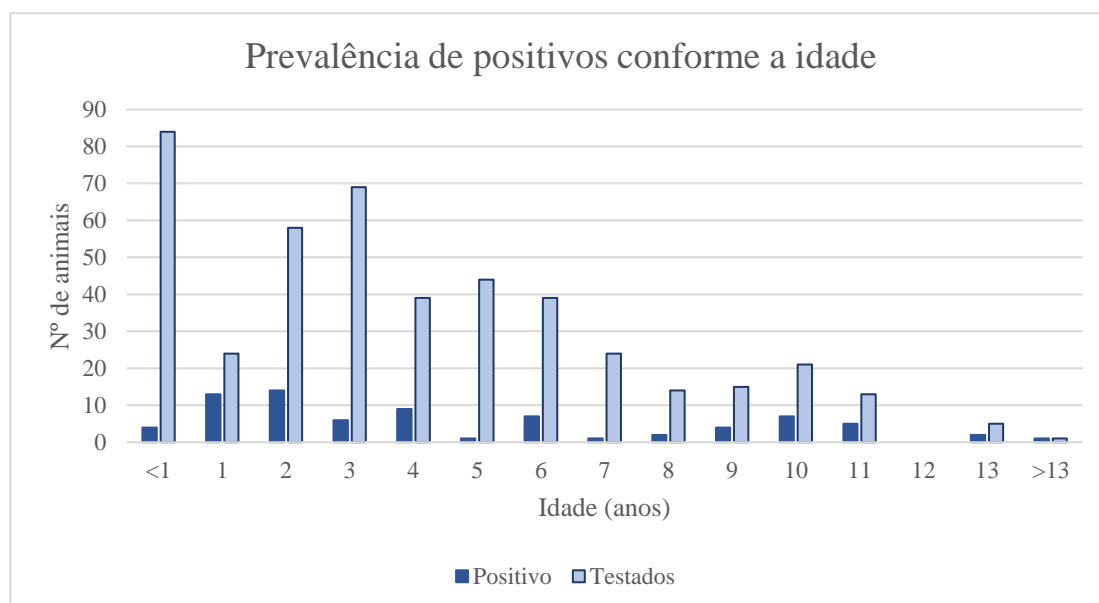
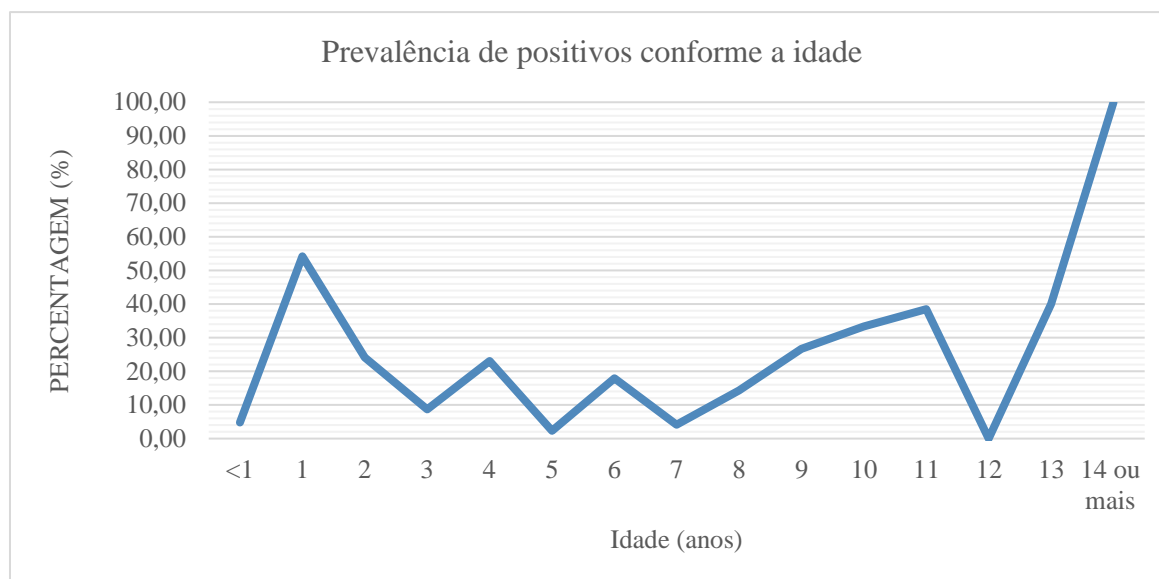


Gráfico 4 - Prevalência de casos positivos conforme a idade



4.2.4. Resultados conforme o sexo

Relativamente ao sexo do animal, 19,3% das fêmeas em estudo foram positivas a esta doença, verificando-se esta condição em apenas 6,8% dos machos (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência dos resultados em função do sexo

	Negativo	Positivo
Feminino	292 (80,7%)	70 (19,3%)
Masculino	82 (93,2%)	6 (6,8%)

4.2.5. Resultados conforme a origem

Analisando os dados relativamente à origem do animal (Tabela 11), verificou-se que quase metade dos animais provenientes de explorações exteriores, ou seja, não nascidos na exploração em estudo, são positivos à Besnoitiose; relativamente aos animais nascidos nesta exploração, apenas 11,9% foram positivos. Considera-se que a origem dos animais é um fator de risco, uma vez que o valor-p obtido foi $<0,01$, com um IC = [2,86 - 9,26]. A *odds ratio* obtida foi de 5,14, o que significa que o facto de o animal não ter nascido na exploração aumenta, em cinco vezes, o risco de se encontrarem infetados por Besnoitiose.

Tabela 11 - Frequência dos resultados em função da origem

	Negativo	Positivo	Total
Exploração	327 (88,1%)	44 (11,9%)	371
Fora	46 (59%)	32 (41%)	32

4.2.6. Resultados conforme a origem da mãe

Os resultados obtidos para animais positivos filhos de mães nascidas em Portugal e filhos de mães nascidas em França foram, respetivamente, 11,4% e 44,2% (Tabela 12). De acordo com o valor-p obtido, $<0,01$, verifica-se que a origem da mãe é um fator de risco, havendo 6,14 vezes maior probabilidade de os filhos de mães nascidas em França contraírem esta doença.

Tabela 12 - Frequência dos resultados em função da origem da mãe

	Positivo	Negativo
França	34 (44,2%)	43 (55,8%)
Portugal	42 (11,4%)	328 (88,6%)

4.2.7. Resultados - análise multivariada (regressão logística)

Quando se fez a associação de mais de uma variável, através do teste de regressão logística, os resultados obtidos foram diferentes dos resultados obtidos pelo teste de qui-quadrado ou teste de *Fisher*, nos quais se avaliavam apenas duas variáveis de cada vez (Tabela 13).

Tendo o resultado como variável dependente, verifica-se que a idade estar compreendida entre 1 e 3 anos, ou ser superior a sete anos ($p<0,01$) bem como as raças Charolesa e Salers ($p<0,01$) continuam a ser fatores de risco, sendo que a origem da mãe e o sexo perdem significância.

Através da *odds ratio*, conclui-se que os animais com idade superior a 7 anos têm 27 vezes maior probabilidade de estar infetados com Besnoitiose sendo esta 10 vezes superior nos animais com idade compreendida entre 1 e 3 anos. Comparativamente com os animais cruzados, os animais da raça Salers apresentam um risco 14,6 vezes superior e os animais de raça Charolesa apresentam um risco 5,3 superior de estarem infetados.

Tabela 13 - Resultados da regressão logística - resultado em função das variáveis idade, origem da mãe, sexo e raça

	Valor de Erro estimado z (Pr> z)				Odds ratio	
Intercept	-4,4167	0,9307	-4,746	0.00000208	***	
Sexo (T.M)	-0.5859	0.5460	-1.073	0.283222		0,56
Origem_mãe	-0.4723	0.6412	-0.737	0.461422		0,62
idade_classes (T>7)	3.2949	0.7124	4.625	0.00000375	***	26,97
idade_classes (T1-3)	2.3159	0.6108	3.792	0.000149	***	10,13
idade_classes (T3-5)	2.1622	0.6801	3.179	0.001477	**	8,69
idade_classes (T5-7)	2.0682	0.7557	2.737	0.006204	**	7,91
Raça (TBlonde)	2.7443	1.3016	2.108	0.034997	*	15,55
Raça (TCharoles)	1.6626	0.4668	3.562	0.000368	***	2,27
Raça (T.Limousine)	0.6831	0.4735	1.443	0.149073		1,98
Raça (T.Salers)	2.6796	0.7476	3.584	0.000338	***	14,58
Significância:						
0***; 0,001**; 0,01*; 0,05.;0,1;1						

4.3.Discussão

Neste estudo faz-se uma caracterização serológica de uma exploração em relação ao parasita *B. besnoiti*.

Os resultados obtidos mostram que os fatores raça e idade são estatisticamente significativos, ou seja, são fatores de risco para esta doença.

A prevalência real verificada nesta exploração, 18,58%, encontra-se abaixo do valor de 33% (0,7-72,4%), descrito por Waap *et al.* (2014), relativo à prevalência média de casos positivos intraexploração em Portugal. Os baixos valores poderão ser explicados por duas razões: pela introdução recente da infeção e pela transmissão lenta desta doença dentro da vacada.

A prevalência nos vitelos é muito baixa (3,71%), comparativamente com a dos animais adultos (21,94%), confirmando-se, assim, que esta doença tem uma incidência maior em animais mais velhos do que naqueles com menos de um ano de idade, o que está de acordo com a totalidade dos estudos efetuados. Estes valores podem justificar-se pelo facto dos insetos picadores, possíveis vetores da doença, serem atraídos pelo tamanho do hospedeiro e por qualidades de origem animal, como a emissão de CO₂, que vai sendo maior à medida que os animais crescem (Konstantinov & Ul'ianov, 1988; Torr *et al.*, 2006). O facto de os animais serem mais velhos também aumenta a probabilidade de serem picados pelos insetos uma vez que os animais mais jovens apresentam taxas maiores de atividades defensivas, reduzindo assim o risco de picada por estes artrópodes (Torr & Mangwi, 2000). O aparecimento de vitelos positivos à Besnoitiose, embora em número muito reduzido, poderá ser justificado pela transmissão passiva de anticorpos através do colostro das mães infetadas; considera-se que os anticorpos maternos podem persistir até aos seis meses de idade nos vitelos alimentados com colostro materno (Shkap *et al.*, 1994); eventualmente, anticorpos protegem os animais de infeções naturais; no entanto, como a colheita de sangue foi feita aleatoriamente, nenhuma das mães destes vitelos foi testada. Seria interessante proceder-se à testagem das mesmas para verificar o seu estatuto relativamente a esta doença.

Verificou-se um pico de positividade de aproximadamente 55% nos animais com um ano de idade; esta observação não está de acordo com a bibliografia existente sobre esta doença, uma vez que esta afirma que a doença surge sobretudo em animais com idades mais avançadas. A infeção nestes animais pode ter acontecido quando estes se encontravam em fase de aleitamento, com as mães, uma vez que se tratam de animais de carne, cujo desmame só é efetuado quando o vitelo já tem pelo menos seis meses de idade; o risco de transmissão é elevado quando os vitelos permanecem muito tempo com as progenitoras e caso os animais estejam estabulados no mesmo local (mesmo que separados fisicamente) (Hornok *et al.*, 2015).

Verificou-se também que a maioria das progenitoras dos animais analisados com este escalão etário era de origem francesa (60%, aproximadamente). A descida dos valores da prevalência de *B. besnoiti* nos animais a partir dos dois anos de idade, pode ser justificada pelo facto de um grande número sair da exploração nesta altura (tanto para venda de reprodutores, como para abate no matadouro), sendo assim, a sua quantidade na exploração, inferior. No entanto, à medida que a idade dos animais vai avançando, verifica-se novo aumento na prevalência de casos positivos de Besnoitiose, estando estes dados de acordo com estudos realizados anteriormente (Fernández-García *et al.*, 2010; Janitschkev & Bigalke, 1984). Verifica-se 0% de casos positivos em animais com 12 anos uma vez que nenhum dos animais estudados tinha esta idade; apesar desta exceção, pode observar-se, no gráfico 4, que a prevalência é sempre crescente a partir dos 7 anos. Isto poderá dever-se ao facto de, ao estarem mais tempo na exploração, os animais serem suscetíveis aos vetores da doença durante mais tempo; outra razão possível é o facto de os anticorpos anti-*Besnoitia* nunca desaparecerem, ou seja, permanecem para sempre em circulação e por isso os animais estão permanentemente infetados, sendo que a infeção se vai propagando ao longo do tempo. Segundo Hofmeyer (1945) (citado em Ferreira, 1985), a Besnoitiose só se contrai uma única vez: os animais clinicamente curados permanecem portadores e desenvolvem uma imunidade que permanece enquanto os quistos se mantiverem viáveis, geralmente nos oito anos seguintes à infeção, e portanto, o número de casos positivos de Besnoitiose nunca diminui ao longo dos anos a não ser que os animais sejam eliminados do grupo.

Observa-se uma incidência muito maior do que o seria espectável na raça Salers, na qual praticamente metade do efetivo se encontra positivo; esta observação está de acordo com o que foi verificado na década de 80, em que se considerava que a raça Salers era a mais suscetível de ficar infetada por *B. besnoiti* (Cortes *et al.*, 2003). No entanto, mais tarde considerou-se que não existia qualquer predisposição racial para esta doença, sendo que todas as raças poderiam ser atingidas de igual modo, o que não vai ao encontro com o que foi verificado neste estudo. Poderá haver uma predisposição genética nesta raça, desconhecida até ao momento; no entanto, a grande maioria das progenitoras dos animais desta raça que foram positivos neste estudo epidemiológico é de origem francesa. Uma vez que nesta exploração os animais se encontram separados por lotes conforme as raças, os eventos de transmissão nesta raça a um ritmo muito mais rápido podem ser explicados pela compra de maior número de animais infetados desta raça em França ou pela proximidade dos animais (a separação física, a uma distância mínima de 20 metros, é bastante eficaz na redução da transmissão) (Lambin *et al.*, 2010); os animais da raça Salers podem ter contaminado os restantes animais da exploração, no entanto, se esses estiverem mais separados as hipóteses de transmissão são, também, mais baixas. Seria

interessante realizar-se uma história pregressa dos animais da raça Salers para entender melhor como e onde foram infetados.

A raça Blonde d'Aquitaine também apresentou uma prevalência elevada, no entanto, foram analisados apenas 4 animais desta raça, dois deles com 13 anos de idade; o número de animais desta raça analisados não permite tirar conclusões sobre uma maior suscetibilidade à doença. Uma observação interessante é o facto de se ter verificado que os animais cruzados são os que apresentam uma maior resistência à Besnoitiose, independentemente da idade; após análise dos dados verificou-se que estes animais são todos nascidos em Portugal, e não são cruzados de raça Salers, o que pode ser uma justificação para o facto de a prevalência ser menor.

Verificou-se uma prevalência de casos positivos de 41% em animais cuja origem era externa à exploração, isto é, animais comprados a outras explorações que tanto podem ser portuguesas como estrangeiras; os animais poderão vir já infetados da sua origem, ou, por outro lado, ao estarem mais sujeitos a fatores de stress devido ao transporte, testes de pré-movimentação, vacinações entre outras operações de manejo, terem uma maior suscetibilidade de se infetarem na altura da sua chegada à exploração. Os animais nascidos no local podem, também, adquirir uma proteção parcial por imunidade passiva, quando expostos a uma infeção por *B. besnoiti* no campo (Fayer *et al.*, 1989; Fiege *et al.*, 1992; Zu *et al.*, 1992, citados em Shkap *et al.*, 1994).

Verificou-se também uma prevalência de seropositividade à *Besnoitia* quase três vezes superior nas fêmeas relativamente aos machos. Segundo a bibliografia não existe predisposição devido ao sexo (Bigalke & Prozesky, 2004). Os resultados obtidos neste estudo podem justificar-se pelo facto de todos os machos testados serem bastante jovens, tendo a sua maioria entre 6 meses e 3 anos de idade. De facto, ao fazer-se uma análise multivariada (regressão logística), associando-se várias variáveis ao mesmo tempo, deixou de se ter como fatores de risco a origem da mãe e o sexo do animal, uma vez que estes perderam significância. No entanto, a idade do animal e a raça parecem continuar a ter influência nos resultados. Animais com mais de 7 anos têm 27 vezes maior probabilidade de estarem infetados com *Besnoitia* relativamente aos animais com idade inferior a um ano; já contrariamente ao que está descrito na literatura, os animais com idade entre um e três anos de idade, apresentaram uma prevalência muito alta, mesmo com a inserção de mais variáveis. De acordo com este teste, a raça Salers continua com um risco muito mais elevado comparativamente com as outras raças, sendo que probabilidade de infeção com *Besnoitia* é cerca de 15 vezes superior aos animais de raça cruzada. Seria interessante aprofundar os estudos nesta raça em particular, para perceber se há, de facto, uma maior predisposição, ou se há outros fatores que possam estar a contribuir para uma maior prevalência nesta raça, como por exemplo, uma origem comum dos animais, podendo ser a mesma região de França ou o mesmo fornecedor. A raça Charolesa também apresenta alguma

influência, sendo a probabilidade de encontrar positivos com *Besnoitia* cerca de 5 vezes superior à dos animais de raça indefinida. A importação de animais infetados de França pode ter contribuído/estar a contribuir para uma maior prevalência nestas raças, comparativamente aos animais cruzados, nascidos na exploração.

4.4. Conclusão

Dada a relevância da Besnoitiose bovina, é necessário um maior investimento na área da epidemiologia, diagnóstico e tratamento desta doença. Devem ser efetuados mais estudos incidindo nas possíveis vias de transmissão do parasita, nomeadamente a transmissão direta por contato direto durante o acasalamento, estudos entomológicos que permitam quantificar a abundância de moscas-do-estábulo e tabanídeos, tentando perceber-se qual o potencial papel destes insetos na transmissão da doença; deve também ser estudado o papel de ruminantes selvagens como potenciais reservatórios do parasita bem como a relação entre *B. besnoiti* e outras espécies de *Besnoitia* isoladas de ungulados, na tentativa de entender o risco de infeção para os ruminantes domésticos. O desenvolvimento de novos marcadores genéticos e ferramentas bioquímicas no futuro, tal como recomendado na declaração da Autoridade de Segurança Alimentar, irá não só permitir a existência de mais estudos epidemiológicos e melhorar o diagnóstico, mas também ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos (EFSA, 2010).

Deve proceder-se à quantificação de efetivos bovinos assintomáticos, mas infetados por este parasita, para que seja possível efetuar uma avaliação da dimensão epidemiológica desta doença, até porque se tem verificado uma grande incidência de casos em animais provenientes de importação. É possível que em Portugal esta enfermidade esteja a adquirir um forte impacto devido a importações de efetivos reprodutores que se têm verificado no sentido de introduzir raças com maior aptidão creatopoiética e do aumento produtivos dos rebanhos já aqui existentes.

É importante esclarecer se o que está a transmitir a Besnoitiose bovina em Portugal é a importação dos animais, ou se, por outro lado, são os animais, que, nunca tendo sido expostos anteriormente ao agente e nem tendo qualquer nível prévio de imunização, juntamente com o facto de o seu sistema imunitário se encontrar deprimido devido ao stress do transporte, já no nosso país, ao contactarem com a Besnoitiose, ficam infetados. Também se poderá por a hipótese de serem ambas as formas a intervirem na epidemiologia deste parasita em Portugal (Cortes *et al.*, 2003). Considerando que o Alentejo exporta bovinos para todas as regiões do país, sem qualquer teste de pré-movimentação para Besnoitiose, torna intrigante o facto desta doença não estar disseminada por mais regiões.

Relativamente à exploração em estudo, recomenda-se a implementação de estratégias de controlo da Besnoitiose mais rigorosas, que poderão passar pela não aquisição de animais ao estrangeiro, principalmente a França, ou caso esta aconteça, que os animais sejam provenientes de explorações indemnes certificadas ou com teste de pré-movimentação para Besnoitiose.

Todos os animais comprados a partir de outras zonas de Portugal, principalmente na região do Alentejo, devem ser testados serologicamente, ou pelo menos, deve ser feito um exame da conjuntiva escleral minucioso para pesquisa de quistos parasitários de *B. besnoiti*, e proceder à sua movimentação apenas no caso de se apresentarem negativos.

Durante as ações de profilaxia (sobretudo vacinação e desparasitação) e de tratamento, devem ser desinfetadas ou, no caso de serem descartáveis, mudadas as agulhas de animal para animal. Deverá ser feito um refugo mais precoce dos animais, assim como de todos os animais da raça Salers que tenham origem estrangeira. Em animais cuja finalidade seja a engorda, deve apostar-se no cruzamento, uma vez que a raça indefinida mostrou ser a mais resistente a esta doença.

A melhor alternativa, uma vez que não existe uma estratégia de vacinação eficaz, passaria pela eliminação sistemática de todos os animais doentes e dos infetados (portadores latentes), no sentido de diminuir a infeção intra-rebanho. Quando isto não for possível, devido à elevada prevalência na exploração, ou valor dos animais, recomenda-se que os animais serologicamente positivos, em particular os da raça Salers, sejam mantidos numa pastagem mais afastada dos restantes animais, evitando a partilha de pastos, já que a distância é um fator limitante para a transmissão de vetores artrópodes.

5. Bibliografia

- Adiagene. (2016). Adiavet™ *Besnoitia* real time test pour la detection *Besnoitia besnoiti* par amplification - manuel d'instruction, acedido a 25 de Maio de 2018, disponível em <http://www.biomerieux.com.au/veterinary/adiavet-bovine>.
- Agosti, M., Belloli, A., Morini, M. & Vacirca, G. (1994). Segnalazione di un focolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis*, 15, 5-6.
- Álvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419–1435, disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182014000729>
- Alzieu, J. P., Dorchies, P., Schelcher, F., & Gottstein, B. (2007). L'extension de la besnoitiose bovine en France. *Le Point Vétérinaire*, 276, 37–43.
- Basso, W., Schares, G., Gollnick, N. S., Rütten, M., & Deplazes, P. (2011). Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti*—Experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Veterinary Parasitology*, 178(3–4), 223–234, disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.01.027>
- Basson, P. A., McCully, R. M., & Bigalke, R. D. (1970). Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 37(2), 105–126, disponível em: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/46336/12basson1970.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Beck, R., Štoković, I & Pleadin, J. (2013). Bovine besnoitiosis in Croatia 2nd [abstract]. In Vaz Y (Ed.), Proceedings of the 2nd International meeting on apicomplexan parasites in farm animals, Kuşadası, Turquia, 31 Outubro-2 Novembro, p.64.
- Besnoit, C., & Robin, V. (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Revue Vétérinaire*, 37, 649–663.
- Bigalke, R. D. (1960). Preliminary observations on the mechanical transmission of cyst organisms of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis* newstead, 1910. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 31, 37–44, disponível em: <http://journals.co.za/docserver/fulltext/savet/31/1/884.pdf?expires=1526990995&id=id&accname=guest&checksum=2DEF590B09614A9AE8AB9B9E32E68A46>
- Bigalke, R. D. (1968). New concepts on the epidemiological features of bovine Besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 35(1), 3–138, disponível em: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/54195/1bigalke1968.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bigalke, R. D. (1981). Besnoitiosis and Globidiosis. Ristic, R., McIntyre, I. (Eds.), *Diseases of Cattle in the Tropics; Marunus Nijhoff, The Hague, The Netherlands*, 429–442.
- Bigalke, R. D., Basson, P. A., McCully, R. M., & Bosman, P. P. (1973). Studies in cattle on the development of a live vaccine against bovine besnoitiosis. *Biennial Scientific Congress, South African Veterinary Association, Pretoria*, 2–3.

- Bigalke, R. D., Basson, P. A., McCully, R. M., Bosman, P. P., & Schoeman. (1974). Studies in cattle on the development of a live vaccine against bovine besnoitiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 45(3), 207–209.
- Bigalke, R. D., & Naudé, T. W. (1962). The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 33, 21–27.
- Bigalke, R. D., & Prozesky L. (2004). Besnoitiosis. In: Coetzer JAW, Tuskien RC, Editors. *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa, 1(2ª edição), 351–359.
- Correa, A. P. A., Queiroz, E. & Trevisan, N. (n.d.), Teste do Qui-Quadrado, Bioestatística, Universidade Federal do Paraná, disponível em: http://www.leg.ufpr.br/lib/exe/fetch.php/disciplinas:ce001:teste_do_qui-quadrado.pdf
- Cortes, H. C. E., Reis, Y., Waap, H., Vidal, R., Soares, H., Marques, I., ... Leitão, A. (2006). Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 141(3–4), 226–233, disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.05.022>
- Cortes, H., Ferreira, M. L., Silva, J. F., Vidal, R., Serra, P., & Caeiro, V. (2003). Contribuição para o estudo da Besnoitiose bovina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98(545), 43–46.
- Cortes, H., Leitão, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis: A disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges,). In *Parasitology* (Vol. 141), disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182014000262>
- Cortes, H., Leitão, A., Vidal, R., Vila-Viçosa, M. J., Ferreira, M. L., Caeiro, V., & Hjerpe, C. A. (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Veterinary Record*, 157(9), 262–264, disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.157.9.262>
- Domingues, J., Ferrador, M., Santos, M.S., Stilwell, G. (2017, Novembro). Caso clínico atípico de Besnoitiose (*Besnoitia besnoiti*) num touro Limousine. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Poster apresentado nas XIX Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria, Ponta Delgada, Açores.
- Domingues, J., Ferrador, M., Santos, M.S., Stilwell, G. (2018). Besnoitiosis as an emerging and exotic disease – new clinical features in breeding bulls. Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Poster a ser apresentado no World Buiatric Congress, Japão em Agosto de 2018
- Dorchies, P., Schelcher, F., & Gottstein, B. (2007). L ' extension de la besnoitiose bovine en France, Maladies parasitaires, Tableau clinique et lésionnel, 37–43.
- Dubey, J. P., Chirukandoth, S., Rosenthal, B. M., Lindsay, D., Grisard, E., & Vitor, R. W. A. (2003). Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodon* n.sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent *Akodon montensis* in Brazil. *Parassitologia*, 45, 61–70.

- Dubey, J. P., Shkap, V., Pipano, E., Fish, L., & Fritz, D. L. (2003). Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 50, 240–244.
- Dubey, J. P., & Yabsley, M. J. (2010). *Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*). *Parasitology (Cambridge University)*, 137(12), 1731–1747.
- EFSA. (2010). Scientific statement on bovine besnoitiosis. *European Food Safety Authority*, 8. disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1499>.
- Ellis, J. T., Holmdahl, O. J. M., Ryce, C., Njenga, J. M., Harper, P. A. W., & Morrison, D. A. (2000). Molecular Phylogeny of *Besnoitia* and the Genetic Relationships Among *Besnoitia* of Cattle, Wildebeest and Goats. *Protist*, 151(4), 329–336, disponível em: [https://doi.org/10.1078/S1434-4610\(04\)70031-0](https://doi.org/10.1078/S1434-4610(04)70031-0)
- Fernández-García, A., Alvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martínez, A., Marcén, J. M., Rojo-Montero, S., ... Ortega-Mora, L. M. (2010). Development and use of an indirect ELISA in outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Veterinary Record*, 166, 818–822.
- Ferrador, M., Santos, M.S., Domingues, J., Stilwell, G. (2018, Abril). Aplicação tópica de anestésicos locais para controlo da dor durante a aparagem curativa de lesões podais de vacas leiteiras – dados preliminares. Laboratório de Comportamento e Bem-Estar Animal – CIISA. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Poster apresentada no 8º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários, Lisboa.
- Ferreira, M. L. (1985). Besnoitiose bovina. Aspectos Anatomo-Clínicos. Maputo, R.P Moçambique: Tipografia Minerva Central.
- Franco, E., & Borges, I. (1915). Nota sobre a Sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária, Ano XIV*, 255–299.
- Franco, E., & Borges, I. (1916). Sur la sarcosporidiose bovine. *Arquivo do Instituto Bacteriológico Camara Pestana*, 4, 269–289.
- Frenkel, J. K. (1977). *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *Journal of Parasitology*, 63, 611–628.
- Frey, C. F., Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L. M., Benavides, J., Marcén, J. M., Castillo, J. A., ... Álvarez-García, G. (2013). Chronic bovine Besnoitiosis: Intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), 95–103, disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.04.023>
- Gentile, A., Militerno, G., Schares, G., Nanni, A., Testoni, S., Bassi, P., & Gollnick, N. S. (2012). Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy - first in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Veterinary Parasitology*, 184, 108–115.
- Goldman, M., & Pipano, E. (1983). Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Tropical Animal Health and Production*, 15, 32–38.
- Gollnick, N.S., Gentile, A. & Schares, G. (2010). Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Veterinary Record*, 166, 599.

- Gollnick, N. S., Scharr, J. C., Schares, G., & Langenmayer, M. C. (2015). Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. *BMC Veterinary Research*, 11, 35, disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0344-6>
- Hornok, S., Fedák, A., Baska, F., Basso, W., Dencsó, L., Tóth, G., ... Dénes, B. (2015). Vector-borne transmission of *Besnoitia besnoiti* by blood-sucking and secretophagous flies: epidemiological and clinicopathological implications. *Parasites & Vectors*, 8, 450, disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1058-0>
- Hornok, S., Fedák, A., Baska, F., Hofmann-Lehmann, R., & Basso, W. (2014). Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasites and Vectors*, 7, 20.
- Jacquiet, P., Lienard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174(1–2), 30–36.
- Janitschke, K., De Vos, A. J., & Bigalke, R. D. (1984a). Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 51(4), 239–243.
- Juste, R. A., Cuervo, L. A., Marco, J. C., & Oregui, L. M. (1990). La besnoitiosis bovina: desconocida em España? *Medicina Veterinaria*, 7, 613–618.
- Konstantinov, S. A., & Ul'ianov, K. N. (1988). Effect of cattle color, age, size and behavior on the intensity of the attack and sucking attachment by gadflies. *Parazitologiya*, 22(6), 488–495, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2976146>
- Lambin, E. F., Tran, A., Vanwambeke, S. O., Linard, C., & Soti, V. (2010). Pathogenic landscapes: Interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *International Journal of Health Geographics*, 9(1), 54, disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-54>
- Langenmayer, M. C., Scharr, J. C., Sauter-Louis, C., Schares, G., & Gollnick, N. S. (2015). Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: hematological alterations and changes in serum chemistry and enzyme activities. *BMC Veterinary Research*, 11(32), 1–12, disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0326-8>
- Lesser, M., Braun, U., Deplazes, P., Gottstein, B., Hilbe, M. & Basso, W. (2012). First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 154, 469-474.
- Lenfant, F., Franc, M., Jacquiet, P., Grisez, C., Prevot, F., Alzieu, J. P., ... Lienard, E. (2014). Immunofluorescence antibody test of Bovine Besnoitiosis 327. *Revue Médecine Veterinaire.*, 165(11–12), 327–333. , disponível em: https://www.revmedvet.com/2014/RMV165_327_333.pdf
- Manuali, E., Lepri, E., Salamida, S., D'Avino, N., Mangili, P., Vitellozzi, G., Grelloni, V. & Filippini, G. (2011). An outbreak of bovine besnoitiosis in beef cattle born in central Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58, 464-467.
- McCully, R. M., Basson, P. A., Niekerk, J. W., & Bigalke, R. D. (1966). Observations on *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 33, 245–276.

- Mehlhorn, H., Klimpel, S., Schein, E., Heydorn, A. O., Al-Quraishy, S., & Selmair, J. (2009). Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. *Parasitology Research*, 104(4), 861–868, disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1267-y>
- Meireles, J., Waap, H., Lourenço, T., Vaz, Y., Peleteiro, M.C., Cortes, H.C.E. & Leitão, A. Bovine besnoitiosis in the region Centro, Portugal. VI Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, 3-5 Abril 2014, INIAV, Oeiras, Portugal. Acedido em 10 de Junho de 2018, disponível em: <http://turdus.fmv.utl.pt/congressospcv/images/stories/congresso2014/LivroResumosVICgresso SPCV 2014.pdf>, p.122.
- Njagi, O. N., Entzeroth, R., Nyaga, P. N., & Musoke, A. J. (2004). Monoclonal antibodies identify two neutralization-sensitive epitopes in *Besnoitia besnoiti* endocytes. *Parasitology Research*, 94(4), 247–253, disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1210-9>
- Olias, P., Schade, B., & Mehlhorn, H. (2011). Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1564–1576, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.006>
- Petrie, A., & Watson, P. (2006a). Hypothesis Tests 3 - The Qui-squared test: comparing proportions, chapter 9. In B. Publishing (Ed.), *Statistics for Veterinary and Animal Science* (2ª Edição, pp. 107–117).
- Petrie, A., & Watson, P. (2006b). Further regression analyses. Multiple logistic regression - a binary response variable. In B. Publishing (Ed.), *Statistics for Veterinary and Animal Science* (2ª Edição, pp. 148–151).
- Pipano, E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Tropical Animal Health and Production*, 29, 86-90.
- Pissarra, H. (2008). *Estudo da Infecção por Besnoitia besnoiti: Aplicação da Imunohistoquímica na Avaliação da Resposta Celular Inflamatória Peri-quística*. Tese de Medicina - Faculdade de Medicina de Lisboa - Universidade de Lisboa.
- Pols, J. W. (1960). Studies on bovine Besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 28(3), disponível em: <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/57071/1pols1960.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, disponível em: <https://www.R-project.org/>
- Ryan, E. G., Lee, A., Carty, C., O'Shaughnessy, J., Kelly, P., Cassidy, J. P., ... De Waal, T. (2016). Bovine Besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in an Irish dairy herd. *Veterinary Record*, 178(24), 608, disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.103683>
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortes, H. C. E., Rostaher, A., Selmair, J., ... Gollnick, N. S. (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 315–322, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.033>

- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J. C., Langenmayer, M. C., ... Gollnick, N. S. (2010). Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Veterinary Parasitology*, 171(1–2), 32–40, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.017>
- Schares, G., Langenmayer, M. C., Scharr, J. C., Minke, L., Maksimov, P., Maksimov, A., ... Gollnick, N. S. (2013). Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 143–154, , disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.011>
- Seargent, ESG, (2018), Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd, disponível em <http://epitools.ausvet.com.au>
- Shkap, V., Pipano, E., Marcus, S., & Krigel, Y. (1994). Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 61(3), 273–275, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7596581>
- Shkap, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L., & Baszler, T. (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology*, 106(1), 35–43, disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00030-4)
- Shkap, V., Waron, H. u., Pipano, E., & Greenblatt, C. (1984). Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 16, 233–238.
- Shkap, V., Yakobson, B. A., & Pipano, E. (1988). Transmission and scanning eletron microscopy of *Bensoitia besnoiti*. *International Jounal of Parasitology*, 18, 761–766.
- Stilwell, G. (2017). O Bem-Estar em Ruminantes. (P. C. e Vida,) (1^a). Lisboa
- Stone, R., & Cundiff, L. (1985). *Breeding cattle for genetic resistance to disease*; Department of Agriculture: Agricultural Research Service, Lincoln, Nebraska disponível em: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1030&context=hruskareports>
- Torr, S. J., & Mangwiro, T. N. (2000). Interactions between cattle and biting flies: effects on the feeding rate of tsetse. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(4), 400–409, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129704>
- Torr, S. J., Mangwiro, T. N. C., & Hall, D. R. (2006). The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research*, 96(1), 71–84, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441907>
- Waap, H. (2015). Epidemiologia e diagnóstico da Besnoitiose bovina em Portugal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Waap, H., Cardoso, R., Marcelino, E., Malta, J., Cortes, H., & Leitão, A. (2011). A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Veterinary Parasitology*, 3–4(178), 217–222.

Waap, H., Nunes, T., Cortes, H., Leitão, A., & Vaz, Y. (2014). Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitology Research*, 113(10), 3703–3711, disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4035-1>

6. Anexos

ANEXO 1 - Protocolo laboratorial – método de imunofluorescência indireta (IFAT)

Método Laboratorial - Pesquisa de *Besnoitia besnoiti*

1. Descongelar amostras de soro;
2. Marcar a lâmina com marcador azul (O) e numerar os poços;
3. Diluição de 1:256
 - a. 315UL PBS – 1º placa;
 - b. 45UL PBS – 2º placa.
4. Colocar 5UL de soro (de cada amostra) em cada poço da placa 1;
5. Colocar 15UL da diluição da 1ª placa para a segunda, depois de homogeneizar;
6. Colocar 15UL da diluição da 2ª placa e colocar na lâmina, no poço respectivo;
7. Colocar 30 minutos na estufa (colocar papel humedecido) (36-37°C);
8. Lavar com PBS (com a ajuda da pipeta) e colocar no suporte de lâminas, previamente cheio com PBS;
9. Colocar no agitador mecânico durante 10 minutos;
10. Secar as lâminas com batimentos suaves no papel, colocá-las na vertical e, se for necessário, usar secador (em modo frio, no mínimo);
11. Adição de conjugado***(+Azul de Evans) em cada poço;
12. Colocar na estufa durante 30 minutos;
13. Lavagem com PBS = ponto 8.
14. Colocar no agitador mecânico durante 10 minutos.
15. Secar (do mesmo modo que no ponto 10).
16. Colocar gotas de glicerina nas lâminas, entre os poços, e colocar uma lamela por cima de cada lâmina.
17. Visualizar ao microscópio ótico com luz ultravioleta (sem luz na sala).

Cálculo para preparação do conjugado:

Nº poços total x 15UL = Volume final	Ex: 96 poços * 15 = 1440UL
- conjugado (1:200)	7,2UL
- Azul Evans (2:200)	14,4UL
	1440-7,2-14,4=1418,4UL

V final – Vconjugado – Vazulevans = VOL PBS necessário

- colocar 1º PBS num *ependorf*, adicionar o azul de Evans e depois adicionar o conjugado.

ANEXO 2 - Prevalência real (geral)

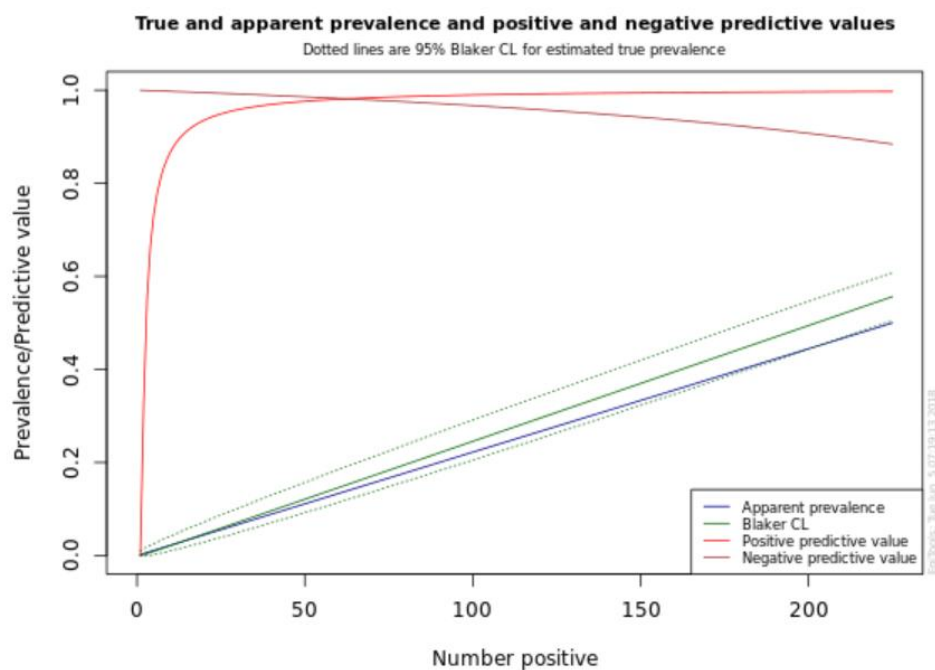
Inputs

Sample size	450
Number positive	76
Test sensitivity	0.896
Test specificity	0.997
Confidence level	0.95
CI type for AP	Wilson
CI type for TP	Blaker

Results

	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Apparent Prevalence (Wilson CL)	0.1689	0.1371	0.2063
Blaker CL	0.1858	0.1502	0.2276
Positive predictive value	0.9855		
Negative predictive value	0.9768		
Likelihood ratio +ve	298.6667		
Likelihood ratio -ve	0.1043		

Plot of prevalence and predictive values



ANEXO 3 - Prevalência real (vitelos)

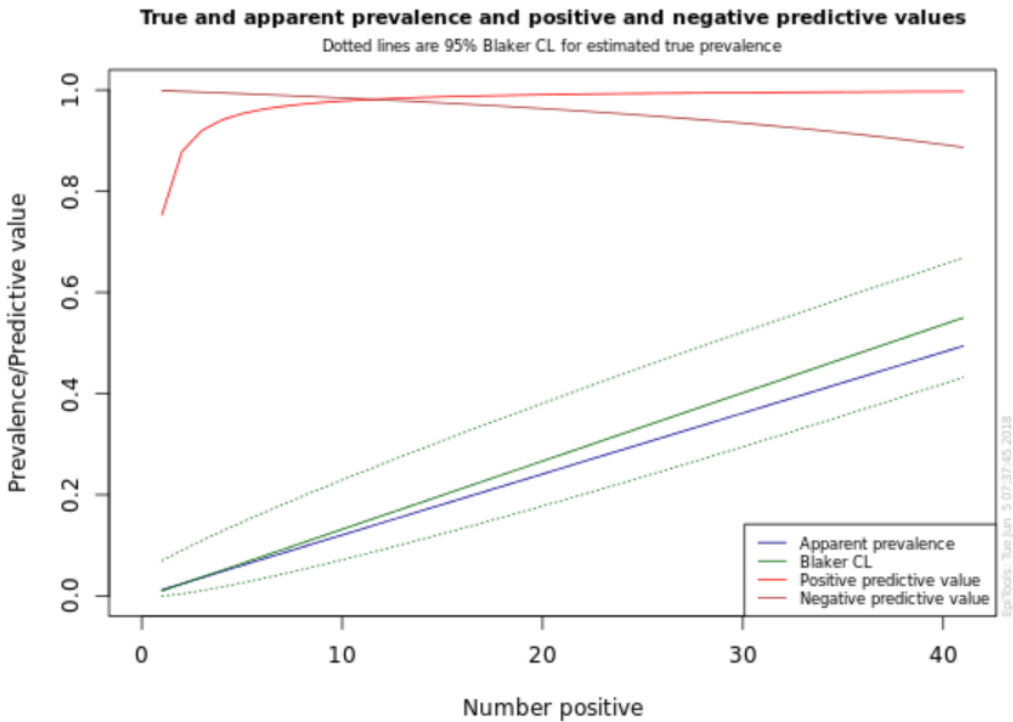
Inputs

Sample size	83
Number positive	3
Test sensitivity	0.896
Test specificity	0.997
Confidence level	0.95
CI type for AP	Wilson
CI type for TP	Blaker

Results

	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Apparent Prevalence (Wilson CL)	0.0361	0.0124	0.101
Blaker CL	0.0371	0.0105	0.1097
Positive predictive value	0.9201		
Negative predictive value	0.996		
Likelihood ratio +ve	298.6667		
Likelihood ratio -ve	0.1043		

Plot of prevalence and predictive values



ANEXO 4 - Prevalência real (adultos)

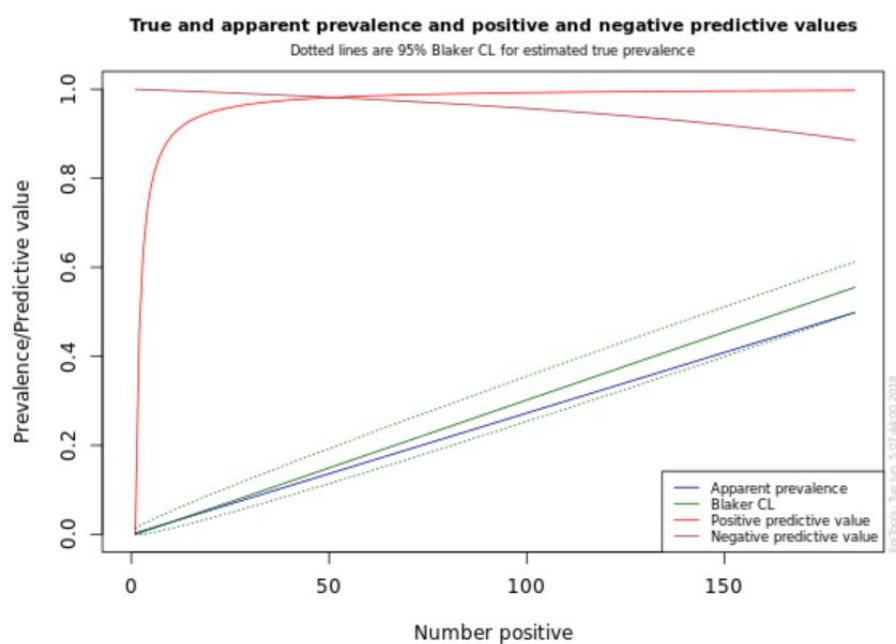
Inputs

Sample size	367
Number positive	73
Test sensitivity	0.896
Test specificity	0.997
Confidence level	0.95
CI type for AP	Wilson
CI type for TP	Blaker

Results

	Estimate	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Apparent Prevalence (Wilson CL)	0.1989	0.1613	0.2428
Blaker CL	0.2194	0.1772	0.2685
Positive predictive value	0.9882		
Negative predictive value	0.9715		
Likelihood ratio +ve	298.6667		
Likelihood ratio -ve	0.1043		

Plot of prevalence and predictive values



ANEXO 5 – Outras atividades desenvolvidas durante o período de estágio: Póster “Caso clínico atípico de Besnoitiose (*Besnoitia besnoiti*) num touro Limousine”



XIX JORNADAS DA ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE BUIATRIA
3|4|5 de Novembro, Ponta Delgada

**CASO CLÍNICO ATÍPICO DE BESNOITIOSE
(*Besnoitia besnoiti*)
NUM TOURO LIMOUSINE**

Domingues, J., Ferrador, M., Santos, M. S., Stilwell, G.
Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
stilwell@fmv.ulisboa.pt



A besnoitiose bovina é uma doença parasitária provocada pelo protozoário *Besnoitia besnoiti*. A sua prevalência parece estar a aumentar em vacadas de carne sobretudo a Sul do Tejo, embora também tenham sido detetados alguns casos noutras regiões. O parasita tem tropismo para a pele e tecido conjuntivo. Os sinais típicos desta doença surgem em duas fases distintas:

- Fase aguda - febre, hiperémia do focinho, pele periorbital e escroto; seguem-se edemas com ligeira tumefação do focinho, espessamento das pregas de pele do pescoço e tórax e anasarca; pele quente, espessa e dolorosa à palpação.
- Fase crónica - espessamento e prurigo progressivo da pele, alopecia progressiva, dermatite com hiperqueratose e formação de crostas; partes da epiderme desprendem-se da pele, deixando áreas acinzentadas, alopecicas e seborreicas; inflamação superficial e escleroderma. Nos casos graves, a escleroderma e alopecia persistem.

Infeções inaparentes com ligeira hipertermia e diminuição do apetite, representam a maioria dos casos no campo. Trata-se de uma doença com elevadas mortalidade e morbilidade. Em machos, a besnoitiose conduz a uma esterilidade total. Pode causar perdas na produção de carne e de peles, um aumento da taxa de refugo e rejeição no matadouro. Não existe tratamento ou vacina eficaz; isto, adicionalmente à falta de conhecimento dos produtores sobre esta patologia, dificulta a implementação de estratégias de controlo e de prevenção. Os animais afetados normalmente são eutanasiados por razões humanitárias. O aumento da besnoitiose na Europa levou a que a EFSA a caracterizasse como doença emergente.

HISTÓRIA CLÍNICA

Um touro de raça Limousine, de 6 anos de idade, quando retirado da vacada, apresentava inapetência, hipertermia e depressão. Foi colocado um imã intra-ruminal e administrados um anti-inflamatório não esteróide e um antibiótico. A resposta à terapêutica foi quase nula.



Figura 1 - áreas edematosas da hiperqueratose e pele grossa, sobretudo na zona ventral (parede ventral do abdómen e tórax, virilhas e axilas).



Figura 2 - Área de dermatite bacteriana secundária.



Figura 3 - Escroto firme e alargado (círculo) do testículo restante.



Figura 4 - Testículo atrofiado e com epidídimo alaranjado.

QUADRO CLÍNICO

Duas semanas mais tarde, o animal apresentava-se letárgico, prostrado, com baixa condição corporal, áreas extensas de pele espessada, gretada e com hiperqueratose. As zonas afetadas eram sobretudo ventrais (parede ventral do abdómen e tórax, virilhas e axilas), com uma aparente simetria nos dois lados do corpo (Fig. 1). O movimento e a defecação revelava-se doloroso e difícil, bem como. As fezes eram duras e secas.

DECISÃO CLÍNICA

Devido ao elevado sofrimento, decidiu-se não levar o touro à manga, optando-se pela eutanásia imediata.

NECRÓPSIA

Grandes extensões da pele hiperqueratinizadas e espessadas, zonas de dermatite bacteriana secundária (Fig. 2), rins edemaciados e testículos atrofiados (Fig. 3) e com parênquima alaranjado (Fig. 4).

HISTOPATOLOGIA

Testículo com fibrose intersticial, aplasia do epitélio germinativo (orquite crónica fibrosa com infertilidade total), Calcificação no lúmen de alguns tubos. Hiperplasia irregular da epiderme com hiperqueratose ortoqueratótica. Visíveis quistos dispersos, tanto na derme superficial como na média e profunda.

Conclusões: Estaria em curso besnoitiose de forma arrastada com dermatite crónica fibrosa complicada por hiperqueratose severa. As restantes lesões associadas ao processo são a orquite crónica fibrosa.

DISCUSSÃO

Trata-se de um caso de besnoitiose de evolução lenta e com lesões bastante atípicas, sendo a sua descrição útil para clínicos de campo, de forma a que a doença possa ser diagnosticada mais cedo e o eventual envio para abate ou a eutanásia possam ser seleccionados em tempo útil.

REFERÊNCIAS:

Cortez, H., Ferreira, M.L., Silva, J.T., Vêdo, R., Serra, P., Cavale, V. (2008). Contribuição para o estudo da besnoitiose bovina em Portugal. *Revista Portuguesa das Ciências Veterinárias*, 58 (245) 43-46.

Cortez, H., Fidalgo, T., Vêdo, R., Ferreira, M.L.T., Cavale, V. (2012). Bovine besnoitiosis, its epidemiological aspects in Portugal and perspectives. *Livro do Congresso de Ciências Veterinárias - 110 Anos da SPQV* - (pp. 307-308) (ISBN 972-97376-0-7)

Wagaj, H., Neves, T., Cortez, H., Lucifora, A., Vêdo, V. (2015). Prevalência da besnoitiose bovina em Portugal - Questionário aos Médicos Veterinários de campo. *Revista Portuguesa das Ciências Veterinárias*, 120 (555-556) 203-208.

Wagaj, H.M.C. (2015). Epidemiologia e diagnóstico da besnoitiose bovina em Portugal. Tese de doutoramento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.

ANEXO 6 - Outras atividades desenvolvidas durante o período de estágio: Póster “Aplicação tópica de anestésicos locais para controlo da dor durante a aparagem curativa de lesões podais de vacas leiteiras – dados preliminares”



8º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários
14 e 15 de Abril de 2018, Lisboa

APLICAÇÃO TÓPICA DE ANESTÉSICOS LOCAIS PARA CONTROLO DA DOR DURANTE A APARAGEM CURATIVA DE LESÕES PODAIS DE VACAS LEITEIRAS – DADOS PRELIMINARES

Margarida Ferrador, Maria Sara Santos, Joana Domingues, George Stilwell¹
Laboratório de Comportamento e Bem-Estar Animal, Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
¹ stilwell@fmv.ulisboa.pt

Introdução

As doenças podais de vacas leiteiras em regime intensivo têm um enorme impacto, quer sobre a produção quer sobre o bem-estar animal, sendo responsáveis por grande desconforto e sofrimento. Durante o tratamento das lesões, como úlceras da sola ou doença da linha branca, são necessárias intervenções invasivas e dolorosas. Tais procedimentos podem causar dor intensa, não só dificultando o maneio e pondo em risco a segurança do operador, como também afectando o bem-estar do animal. Assim, o maneio eficaz da dor não só é uma obrigação ética, como também permite uma mais fácil manipulação e um tratamento mais minucioso. Por norma, estas intervenções são realizadas por técnicos não veterinários sem formação ou competência para o controlo médico da dor. Um produto em gel de aplicação tópica (Trisolfen®), composto por lidocaína, como anestésico de rápida acção, e bupivacaína, como anestésico de longa acção, adrenalina, para reduzir absorção dos anestésicos locais e reduzir a hemorragia, e cetimidida, como anti-séptico, demonstrou ter efeito no alívio imediato e prolongado da dor noutros procedimentos em ruminantes (e.g. descorna e castração).

Objetivo

Testar a eficácia da formulação de anestésicos locais tópicos, aplicados durante o procedimento, como forma de maneio e controlo da dor durante e após a aparagem curativa de lesões sangrantes dos cascos (Figura 1).

Material e Métodos

Vacas no período de secagem

1. Avaliação do grau de claudicação antes da contenção → escala de 1 (sem claudicação) a 5 (claudicação severa);
2. Avaliação da reacção do animal a diferentes graus de pressão → Teste de algometria antes da intervenção;
3. Distribuição aleatória a um de dois grupos – C ou T;

Grupo	Descrição
Controlo (C)	Aparagem sem aplicação de anestésico.
Anestésico local (T)	Aplicação do anestésico local sobre a lesão do córion, seguida de aparagem.

4. Teste de algometria após a intervenção;
5. Avaliação cega dos comportamentos de dor e reacção à aparagem curativa → 1- ausente, 2- moderada, 3- severa;
6. Avaliação do grau de claudicação no fim da intervenção.



Figura 1 – Exemplos das doenças podais com indicação para tratamento sob anestesia local.

Resultados preliminares



NOTA: Devido à presença da lidocaína e bupivacaína, está em curso um estudo paralelo para medir a reacção da malabailha castrada no leite.

Referências
 Eggenes, C., Jones, J., & Jones, R. (2015). The effect of a topical anaesthetic on the sensitivity of beef calves to pain. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 3391-3393. doi:10.3181/journal.103.3391
 Jones, J., & Jones, R. (2015). Topical anaesthetic mitigates the pain of castration in beef calves. *Journal of Animal Science*, 111(1), 101-103. doi:10.2527/jas.2015-9781
 Stilwell, G. (2015). Current attitudes to using analgesics, anaesthetics and sedatives in livestock: the pain and public interventions in the field in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 191(3), 101-103. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.001

Discussão e Conclusão

O estudo demonstrou que a utilização de anestesia local tópica com lidocaína e bupivacaína reduz a dor provocada pela aparagem curativa das lesões do casco extensas e severas, melhorando o bem-estar animal e aumentando a segurança para o operador, por redução das reacções violentas associadas à dor. Considerando a apresentação prática em forma de gel, sem necessidade de procedimentos mais morosos ou mão-de-obra mais especializada, a utilização de um medicamento que favorece conforto e elimina algum do sofrimento induzido durante o tratamento, poderá ser uma excelente alternativa para as práticas realizadas até então, tendo o médico veterinário a função de alertar e consciencializar o produtor para boas práticas que visam o bem-estar animal.